



Universidade do Minho



Implementação e validação de um novo método de determinação do perfil de ácidos gordos componentes em alimentos

Francisca da Silva Teixeira

Relatório de estágio apresentado à

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

2018





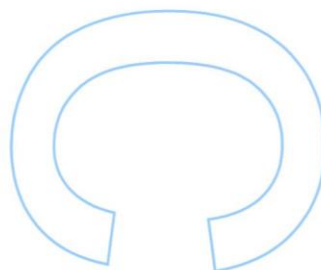
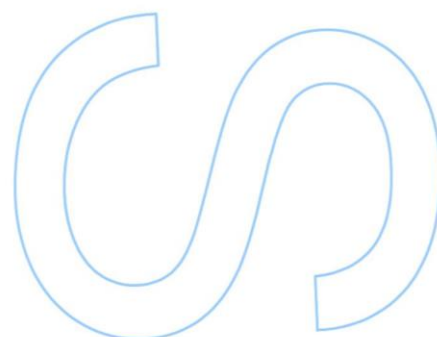
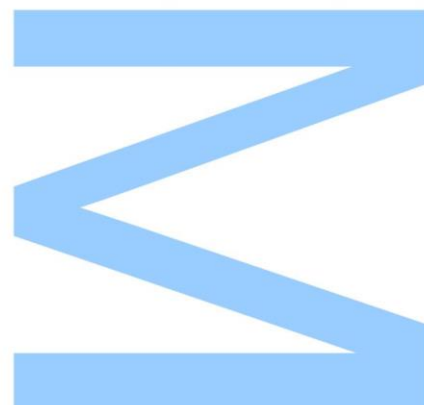
Universidade do Minho



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Francisca da Silva Teixeira

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento de Química e Bioquímica

2018

Orientador

Prof. Doutor Nuno Filipe da Cruz Baptista Mateus

Professor Associado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Laura Cristina Oliveira Sousa

Silliker, S.A.

“Maybe that’s enlightenment enough to know that there is no final resting place of the mind; no moment of smug clarity. Perhaps wisdom is realizing how small I am, and unwise, and how far I have yet to go.”

Anthony Bourdain

Agradecimentos

Ao Saul, pela compreensão, pelo amor de uma vida.

Jeff, por seres um pilar nesta etapa, um grande amigo. Obrigada à Margarida pela disponibilidade, pelo começo de uma amizade muito bonita.

Dr.^a Alice Santos, pela oportunidade do começo da minha vida profissional, pela sabedoria e paixão em doutrinar. Agradeço cada partilha, cada sorriso.

Agradeço a orientação ao Prof. Doutor Nuno Mateus e à Laura Sousa.

Obrigada ao Ricardo, Olga, Joana, Isabel, Laura, Ana e Andreia por serem fantásticos, sempre dispostos a ajudar e com tanto para ensinar. Pela ternura e amabilidade.

A todos os meus amigos, obrigada.

Saul, Filomena e Francisca por serem como família, obrigada pelo apoio.

À minha avó, pelo amor sempre sem limites.

Agradeço especialmente e com todo o meu amor aos meus pais e aos meus irmãos por serem o meu abrigo, a minha casa.

Resumo

O sector da Qualidade e Segurança Alimentar da empresa Mérieux Nutrisciences presta serviços de controlo analítico de acordo com os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração segundo a NP EN ISO/IEC 17025:2005, através de análises microbiológicas, físicas e químicas especializadas para parâmetros nutricionais, contaminantes alimentares, identificação de espécies animais, alergénios, testes de autenticidade e verificação da conformidade de embalagens para contacto alimentar.

De acordo com o Regulamento (EU) Nº1169/2011 do Parlamento Europeu relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, a quantidade de lípidos e ácidos gordos saturados tem de ser referida de forma legível no rótulo dos produtos, e, considerando um padrão alimentar saudável, a Organização Mundial de Saúde refere que as gorduras devem contribuir com 15-30% para o aporte calórico das disponibilidades alimentares diárias. Os ácidos gordos desempenham funções determinantes no crescimento e desenvolvimento humano devido ao seu papel no metabolismo nutricional e na diferenciação celular, sendo precursores de elementos estruturais e metabólicos, bem como de grande contributo energético.

O presente trabalho, realizado na Empresa Mérieux Nutrisciences, propõe a implementação e validação de um novo método de determinação do perfil de ácidos gordos componentes em alimentos, por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID). A validação do procedimento analítico descreve em termos quantificáveis e matemáticos a eficiência do método através da determinação de critérios relevantes de desempenho.

No contexto da validação do método, os parâmetros de repetibilidade foram calculados para seis matrizes, sendo três destas Materiais de Referência Certificados (MRC) que permitem avaliar a aptidão do método. Os critérios de precisão intermédia foram executados exclusivamente através dos MRC's. Tais parâmetros foram analisados para a determinação da quantidade de Ácidos Gordos Totais (AGT), e Ácidos Gordos Saturados (AGS) presentes nas amostras, em g/100 g, obtendo-se um limite de repetibilidade relativo para a determinação de AGT igual a 4,2 % e de 6,4 % para AGS. O limite de precisão intermédia relativo determinado para AGT foi 1,2 % e para os AGS 2,2 %.

A optimização referente à aplicação do método comparativamente ao existente na empresa está descrita e relaciona-se principalmente com o factor tempo, diminuindo o

tempo de análise para o novo método devido especialmente à modificação das condições cromatográficas.

Palavras-Chave:

Ácidos Gordos; Cromatografia Gasosa; Validação; Repetibilidade; Precisão Intermédia.

Abstract

Within the company Mérieux Nutrisciences the Department of food quality and safety control provides analytical control services that are ruled by the general good laboratory practices for analytical laboratories and by the NP EN ISO/IEC 17025:2005. These services include microbiological analysis, physio-chemical analysis of nutritional parameters, analysis of food contaminants, identification of animal species, and allergens, confirmation and validation tests to verify the compliance of the product label information.

In agreement with the Regulation (EU) N°1169/2011, that regulates the food information that is given to the consumers, the amount of lipids and saturated fatty acids has to be present in a clear way in the product label. Considering the World Health Organization recommendation for a healthy diet, the fat should contribute with 15% to 30% of the diary caloric intake. Fatty acids have key roles in the human development and growth due to its function in the metabolism and cell differentiation, as metabolic and structural precursors and sources of energy.

The present work, done at Mérieux Nutrisciences, aims to implement and validate a new method for determination of fatty acids in food by Gas Chromatography with Flame-Ionisation Detector (GC-FID). The validation of the analytical procedure describes in quantifiable and mathematical terms the efficiency of the method by determining relevant performance criteria.

In the context of the methodological validation, the parameters of repeatability were evaluated for six matrices, three of them from Certified Reference Materials (CRMs) that allow to estimate the suitability of the method. Such parameters were analysed for the amount of total fatty acids and saturated fatty acids present in the samples in g/100g, resulting in a relative repeatability limit for the determination of total fatty acids content of 4.2% and 6.4% for the quantification of saturated fatty acids. The relative intermediate accuracy limit for total fatty acids was 1.2% and for saturated fatty acids 2.2%.

The optimization regarding the application of the new method compared to the existing one is described and related mainly with the shortening of time, decreasing due especially to the modification of the chromatographic conditions.

Keywords:

Free Fatty Acids; Gas Chromatography; Validation; Repeatability; Accuracy.

Índice

Resumo	vii
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Figuras	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
1. Introdução	1
1.1. Merieux Nutrisciences	1
1.2. Lípidos	4
1.2.1. Generalidades	4
1.2.2. Ácidos Gordos	5
1.2.3. Composição de ácidos gordos nos alimentos	10
1.2.4. Consumo, implicações nutricionais e patológicas	16
1.2.5. Biossíntese e Metabolismo de Ácidos Gordos	18
1.2.6. Aplicações	22
1.2.7. Métodos de extração e análise utilizados	23
1.3. Cromatografia Gasosa	27
1.4. Validação de Métodos Analíticos	32
2. Material e Métodos	40
2.1. Enquadramento no Procedimento	40
2.2. Aparelhos e utensílios	41
2.3. Reagentes	41
2.4. Hidrólise	42
2.4.1. Tratamento de alimentos em geral	42
2.4.2. Tratamento do Leite	42
2.4.3. Tratamento de queijos, iogurtes e de alimentos infantis à base de leite	42
2.5. Extração e Metilação	43
2.6. Condições Cromatográficas	44
2.7. Cálculos	45
2.7.1. Cálculos aplicados à mistura de padrões C37	45
2.7.2. Cálculos aplicados às amotras	45
3. Resultados e discussão	49
3.1. Matrizes analisadas	49
3.1.1. Preparado de Carne – BIPEA Ready-made dish with meat	51

3.1.2.	Sopa – Soup 04-5520 - 04-5620	53
3.1.3.	Frutos Secos – Dried Fruits 03-6120 - 03-6120;	55
3.2.	Ácidos Gordos Totais – Estudo da Repetibilidade	57
3.3.	Ácidos Gordos Saturados – Estudo da Repetibilidade.....	60
3.4.	Ácidos Gordos Totais – Estudo da Precisão Intermédia.....	62
3.5.	Ácidos Gordos Saturados - Estudo da Precisão Intermédia	64
4.	Considerações Finais e Conclusão	65
5.	Referências Bibliográficas.....	67
6.	ANEXOS	71

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Nomenclatura, estrutura e ponto de fusão dos ácidos gordos saturados mais comuns (Adaptado de IV).....	6
Tabela 2 - Nomenclatura, estrutura e ponto de fusão dos ácidos gordos insaturados mais comuns (Adaptado de IV).....	7
Tabela 3 - Composição de gordura total (GT), ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados de Óleos e Gorduras (Fonte: Tabela da Composição de Alimentos Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2007)...	12
Tabela 4 - Composição de gordura total (GT), ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados de Leite e produtos Lácteos (Fonte: Tabela da Composição de Alimentos Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2007)...	13
Tabela 5 - Composição de gordura total (GT), ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados de Frutos Gordos e Amiláceos (Fonte: Tabela da Composição de Alimentos Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2007)...	14
Tabela 6 - Composição de gordura total (GT), ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados de Carne, Pescado e Ovos (Fonte: Tabela da Composição de Alimentos Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2007)...	15
Tabela 7 - Composição do padrão C37. (adaptado de Buletin 907 Supelco) ⁴⁷	30
Tabela 8 – Quantidade de amostra a pesar de acordo com a matéria gorda desta.	40
Tabela 9 – Matrizes estudadas e respectivo grupo.	49
Tabela 10 – Valores de Repetibilidade e de referência obtidos (g/100 g) para cada ácido gordo, assim como de ácidos Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados (Sat), Monoinsaturados (Mon) e Polinsaturados (Poli) da matriz Preparado de Carne.....	52
Tabela 11 - Valores de Repetibilidade e de referência obtidos (g/100 g) para cada ácido gordo, assim como de Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados (Sat), Monoinsaturados (Mon) e Polinsaturados (Poli) da matriz Sopa.....	54
Tabela 12 - Valores de Repetibilidade e de referência obtidos (g/100 g) para cada ácido gordo, assim como de Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados (Sat), Monoinsaturados (Mon) e Polinsaturados (Poli) da matriz Frutos Secos.	56
Tabela 13 – Valores de AGT obtidos em condições de Repetibilidade para cada matriz estudada.	57
Tabela 14 – Parâmetros analisados para o estudo da Repetibilidade do método.	57
Tabela 15 – Teste de Grubbs.....	58
Tabela 16 – Teste C de Cochran.....	58

Tabela 17 –Valor do Limite da Repetibilidade, Valor do Limite da Repetibilidade Relativo e Coeficiente de Variação Médio Relativo para a quantificação de AGT.	59
Tabela 18 - Valores de Ácidos Gordos Saturados obtidos em condições de Repetibilidade para cada matriz estudada.	60
Tabela 19 -- Parâmetros analisados para o estudo da Repetibilidade do método.	60
Tabela 20 – Teste de Grubbs.	61
Tabela 21 – Teste de Cochran.	61
Tabela 22 - Valor do Limite da Repetibilidade, Valor do Limite da Repetibilidade Relativo e Coeficiente de Variação Médio Relativo para a quantificação de ácidos gordos saturados.	61
Tabela 23 – Valores de AGT obtidos em duplicado e diferença absoluta entre estes (Wi).	62
Tabela 24 – Desvio-padrão da precisão intermédia, coeficiente de variação médio e limite da precisão intermédia calculados.	63
Tabela 25 - Valores de Ácidos Gordos Saturados obtidos em duplicado e diferença absoluta entre estes (Wi).	64
Tabela 26 - Desvio-padrão da precisão intermédia, coeficiente de variação médio e limite da precisão intermédia calculados.	64

Índice de Figuras

Figura 1 – Organização do Instituto Mérieux	1
Figura 2 – Sectores integrantes da empresa Mérieux NutriSciences.....	2
Figura 3 – Organograma referente aos serviços prestados pela Mérieux NutriSciences Portugal.....	3
Figura 4 – Ácido Iso-Heptadecanóico	6
Figura 5 - Ácido ante Iso-Heptadecanóico.....	6
Figura 6 - Estrutura do ácido linoleico e de alguns produtos de hidrogenação	11
Figura 7- Consumo de gordura diária per capita (g/hab/dia) no Mundo, dados de 2005-2007	16
Figura 8 - Biossíntese do pamiato (C16:0).	18
Figura 9 - Metabolismo de ácidos gordos das series n-9, n-6 e n-3.....	19
Figura 10 - Acção da lipase pancreática.....	20
Figura 11 - Transporte de lipoproteínas, ácidos gordos livres (FFA) e quilomicrons (CM) no organismo.	21
Figura 12 – Reacções de transesterificação de TG e de esterificação de ácidos gordos com a formação de Free Acids Methyl Esters.....	25
Figura 13 - Cromatógrafo gasoso (Adaptado de Agilent GC System).....	27
Figura 14 - Diagrama esquemático de um cromatógrafo gasoso.....	28
Figura 15 - Corte transversal das colunas WCOT, SCOT e PLOT.....	29
Figura 16 - Coluna tubular aberta de sílica fundida.....	29
Figura 17 - Cromatograma do padrão relativo a 37 ácidos gordos em coluna SP-2560.	30
Figura 18 - Pressupostos de controlo de qualidade.	32
Figura 19 - Procedimento geral de validação.	34
Figura 20 – Cromatograma relativo à matriz Preparado de Carne.	51
Figura 21 – Cromatograma relativo à matriz Sopa.	53
Figura 22 – Cromatograma relativo à matriz Frutos Secos.....	55

Lista de Abreviaturas

ACP – *Acyl Carrier Protein*

AGS – *Ácido Gordo Saturado*

AGT – *Ácido Gordo Total*

BRC – *British Retail Consortium*

GC – *Gas Chromatography*

CLA – *Conjugated Linoleic Acid*

DGERT – *Direcção Geral do Emprego e das Relações de Trabalho*

DHA – *Ácido Docosahexaenóico*

EPA – *Ácido Eicosapentaenóico*

FABP – *Fatty Acid Binding Protein*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FFA – *Free Fatty Acid*

FID – *Flame Ionization Detector*

FSOT – *Fused Silica Open Tubular*

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Point*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IFS – *International Featured Standards*

ISO – *International Organization for Standardization*

MAG – *Monoacilglicerol*

MG – *Matéria Gorda*

PLOT – *Porous Layer Open Tubular*

PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acid*

SCOT – *Support Coated Open Tubular*

TG – *Triglicerídeo*

WCOT – *Wall Coated Open Tubular*

WHO – *World Health Organization*

1. Introdução

1.1. Merieux Nutrisciences

Em Portugal, a Março de 2008 o grupo Silliker, Inc. adquiriu 80% das ações da EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade Industrial, líder nacional no sector fundada em 1993, Vila Nova de Gaia. Desde 2014 a Silliker Portugal, S.A. torna-se subsidiária da empresa Mérieux NutriSciences ^I.

Para dar resposta aos principais desafios impostos pela saúde pública, Marcel Mérieux fundou em 1897 o Instituto Mérieux, que contribuiu assinalavelmente para o desenvolvimento científico da indústria biotecnológica e da bioquímica clínica, tornando-se líder mundial na produção de vacinas humanas e veterinárias. Posteriormente, em 1996, o Instituto adquiriu a Silliker, empresa Norte Americana de prestação de serviços na área do controlo analítico alimentar, liderada pelo cientista Dr. John Silliker ^{II}.

O Instituto Mérieux possui actualmente 15.000 funcionários e gera cerca de 2 biliões de euros, tendo-se subdividido em três empresas que oferecem soluções complementares para os maiores desafios de saúde pública do mundo: soluções de prevenção com a Mérieux Nutrisciences; diagnóstico *in vitro* com a BioMérieux e imunoterapia com a Transgene (Figura 1) ^{II}.



Figura 1 – Organização do Instituto Mérieux (adaptado de ^{II}).

No contexto do comércio intenso e globalizado, as empresas devem possuir requisitos cada vez mais rígidos em termos de rastreabilidade dos seus produtos e ingredientes, assim como o cumprimento de regulamentos internacionais complexos. Presente em 21 países, com 80 laboratórios acreditados para satisfazer as demandas dos seus clientes, incluindo fabricantes, distribuidores e produtores individuais, a Mérieux NutriSciences oferece uma ampla gama de serviços no sector da qualidade e

segurança alimentar, produtos farmacêuticos e médicos, cosméticos, bens de consumo, água, meio ambiente e agroquímicos (Figura 2) ^{II}.



Figura 2 – Sectores integrantes da empresa Mérieux NutriSciences.

Representando 80% das vendas da empresa, o sector da Qualidade e Segurança Alimentar presta serviços de controlo analítico de acordo com os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração segundo a NP EN ISO/IEC 17025:2005, através de análises microbiológicas, físicas e químicas especializadas para parâmetros nutricionais, contaminantes alimentares, identificação de espécies animais, alergénios, testes de autenticidade e verificação da conformidade de embalagens para contacto alimentar ^{III}.

A vasta especialização é complementada com a prestação de serviços de suporte personalizados como consultoria, auditorias de diagnóstico e auditorias internas com vista à certificação nos sistemas de gestão da qualidade e segurança alimentar (HACCP, ISO 9001, ISO 22000, IFS, BRC entre outros), rotulagem e actualização da legislação, análise sensorial e estudos de consumidor, actuando também como entidade formadora certificada pela Direção Geral do Emprego e das Relações de Trabalho (DGERT) ^{III}.

Assim, a entidade indicada está acreditada como Laboratório de Ensaios, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 e reconhecida pelo Instituto Português de Acreditação com a acreditação Nº L0087-1. De acordo com estes parâmetros de trabalho, a organização estrutural da Empresa encontra-se representada na Figura 3. O serviço laboratorial fragmenta-se em quatro áreas específicas: físico-química, métodos instrumentais de análise, microbiologia e serviços ambientais. A determinação do teor

de celulose, proteína, cinza bruta e de humidade são alguns exemplos de ensaios realizados no laboratório de físico-química. A título de exemplo, o laboratório de métodos instrumentais de análise recorre essencialmente a técnicas cromatográficas e espectroscópicas para a análise de ácidos gordos, colesterol, cálcio, ferro, cobre, cafeína, vitaminas, açúcares componentes entre outros.

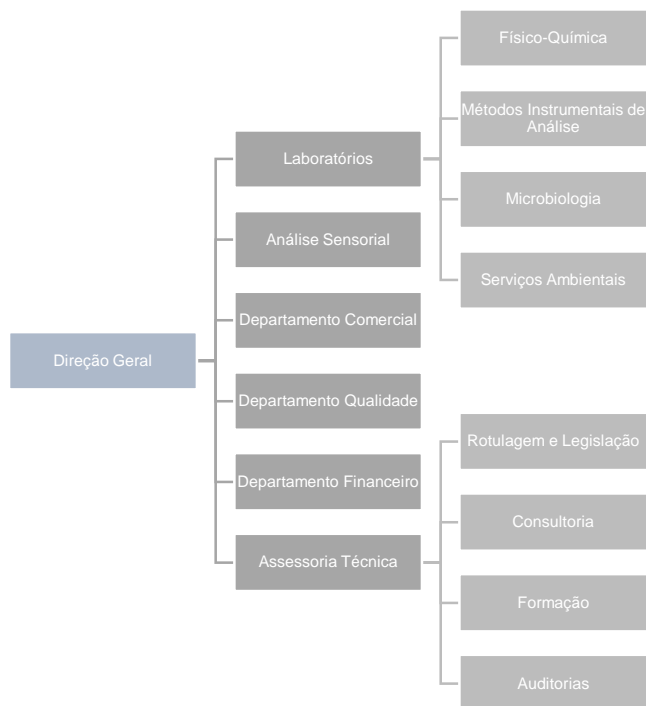


Figura 3 – Organograma referente aos serviços prestados pela Mérieux NutriSciences Portugal.

1.2. Lípidos

1.2.1. Generalidades

Os lípidos são macromoléculas que se distinguem das proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos por apresentarem maior variedade estrutural, não se polimerizarem e serem insolúveis em água. Além disso, são a maior fonte energética fornecendo 9,5 kcal/g enquanto as proteínas e os hidratos de carbono fornecem 4 kcal/g¹.

Em geral dividem-se maioritariamente em duas classes funcionais – de estrutura e armazenamento. Estruturalmente, os lípidos que compõem as membranas celulares (fosfolípidos, glicolípidos e colesterol) representam 5-10% da massa da maioria das células e os lípidos de armazenamento mais de 80% da massa de um adipócito (ácidos gordos e triglicerídeos). Outro tipo de lípidos presentes em menores quantidades no organismo, geralmente caracterizados como esteróis, derivam metabolicamente do isopreno e desempenham funções cruciais como mensageiros extracelulares (hormonas: β -estradiol, testosterona, aldosterona, cortisol), co-enzimas (ubiquinona), vitaminas (A, D, E, K), pigmentos (β -caroteno) e ácidos biliares (ácido taurocólico). As ceras biológicas, obtidas por esterificação de um ácido gordo de cadeia longa com um álcool e produzidas em virtude das suas propriedades repelentes à água e consistência firme são outro tipo de lípidos funcionais produzidos pelos animais e algumas plantas. Outra classe de moléculas de biossíntese a partir de ácidos gordos (ácido araquidónico) classificadas como eicosanóides, está envolvida na produção de dor, febre, regulação da pressão sanguínea, coagulação e reprodução².

Em 2005 o Comité Internacional de Classificação e Nomenclatura de Lípidos por iniciativa do consórcio *LIPID MAPS* desenvolveu e estabeleceu um sistema de classificação abrangente para lípidos com base em princípios químicos e bioquímicos bem definidos e usando uma estrutura projectada para ser extensível, flexível, escalável e compatível com as ferramentas bioinformáticas. Com base neste sistema de classificação, os lípidos foram divididos em oito categorias: acetil, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, policétidos (derivados da condensação de subunidades cetoacil), lípidos esteróis e lípidos de prenol (derivados da condensação de subunidades isopreno)³.

Os triglicerídeos constituem 90% dos lípidos da dieta e são a principal forma de armazenamento de energia metabólica. Consistem em triésteres de glicerol de ácidos gordos⁴.

1.2.2. Ácidos Gordos

Os ácidos gordos desempenham funções determinantes no crescimento e desenvolvimento humano devido ao seu papel no metabolismo nutricional e na diferenciação celular, sendo precursores de elementos estruturais e metabólicos, bem como de grande contributo energético ⁵.

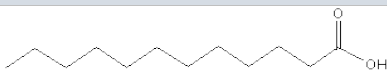
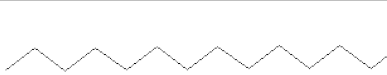
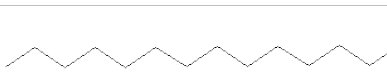
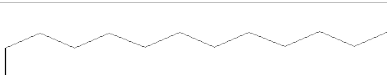



São compostos por um grupo carboxílico (COOH) ligado a um radical alquilo e a sua classificação faz-se de acordo com a presença ou ausência de ligações duplas na cadeia carbonada, sendo insaturados ou saturados respectivamente. Ácidos gordos insaturados podem ser categorizados segundo o número, posição e configuração da dupla ligação. Mais de metade dos resíduos de ácidos gordos dos lípidos vegetais e animais são insaturados e muitas vezes são polinsaturados. Os ácidos gordos bacterianos raramente são polinsaturados, mas geralmente são ramificados, hidroxilados ou contêm anéis de ciclopropano ⁶.

1.2.2.1. Ácidos Gordos Saturados

Os ácidos gordos saturados são moléculas altamente flexíveis que podem assumir uma ampla gama de conformações devido ao facto de haver rotação relativamente livre em torno de cada uma das suas ligações C-C, aglomerando-se facilmente entre si. Os pontos de fusão, como os da maioria das substâncias, aumentam com a sua massa molecular (Tabela 1) ^{1,2}.

Como todos os ácidos gordos, os saturados têm usualmente um número par de átomos de carbono e a seguinte fórmula geral: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, “n” geralmente entre 2 e 22. As suas propriedades fisiológicas e físicas dependem do comprimento da cadeia, assim, ácidos gordos saturados com menos de 6 carbonos, denominados de cadeia curta, têm solubilidade moderada e apresentam um comportamento metabólico e nutricional característico pois são rapidamente absorvidos pelo intestino e podem, inclusive, controlar movimentos de absorção de água e sódio. Surgem em gorduras derivadas do leite, é o caso do ácido butírico (C4:0), presente aproximadamente 3% em massa na manteiga. Ácidos gordos com 6 a 12 carbonos são de cadeia média e estão especialmente presentes no óleo de côco e no cacau. Dos ácidos gordos de cadeia longa (de C14:0 a C24:0), os principais representantes são o ácido láurico (C14:0), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), abundantes na maioria dos óleos vegetais e gorduras animais ⁶.

Tabela 1 - Nomenclatura, estrutura e ponto de fusão dos ácidos gordos saturados mais comuns (*Adaptado de IV*).

Nomenclatura Comum	Nomenclatura Sistemática	Estrutura	Ponto de Fusão (°C)
Láurico C12:0	Dodecanóico		44,2
Mirístico C14:0	Tetradecanóico		53,9
Palmítico C16:0	Hexadecanóico		63,1
Estearico C18:0	Octadecanóico		69,6
Araquidónico C20:0	Eicosanóico		77,0
Beénico C22:0	Docosanóico		81,5
Linhocérico C24:0	Tetracosanóico		88,0

Além dos ácidos gordos saturados com cadeia linear, ácidos gordos com cadeia ramificada encontram-se presentes na gordura do leite e na carne de certos ruminantes. São geralmente monometilados no penúltimo átomo de carbono (posição *iso*, Figura 4) ou no antepenúltimo átomo de carbono (posição *ante-iso*, Figura 5), apresentam geralmente 14 a 17 carbonos. O leite de vaca contém aproximadamente 1,88 g de ácidos gordos de cadeia ramificada por 100 g de ácidos gordos totais ⁷.

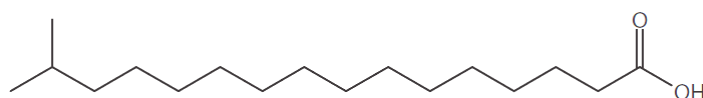


Figura 4 – Ácido Iso-Heptadecanóico

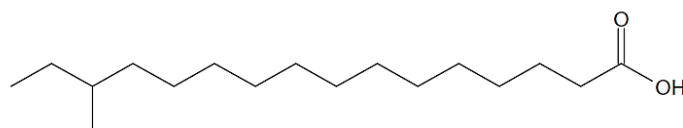


Figura 5 - Ácido ante Iso-Heptadecanóico.

Considerando as suas baixas concentrações, estes ácidos gordos de cadeia ramificada não desempenham nenhum papel enérgico, mas têm uma importância fisiológica bem conhecida. São sintetizados por bactérias que se encontram no estômago dos animais a partir de aminoácidos como leucina, isoleucina ou valina. Dada

a ingestão média de 400 mg destes ácidos gordos na dieta normal, a hipótese mais plausível para sua função é a influência positiva no desenvolvimento de bactérias comensais no sistema digestivo uma vez que estes ácidos gordos de cadeia ramificada estão altamente concentrados nas paredes de muitas bactérias e em particular de muitos probióticos associados a propriedades digestivas e anticancerígenas ⁷.

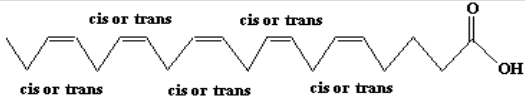
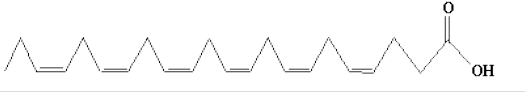
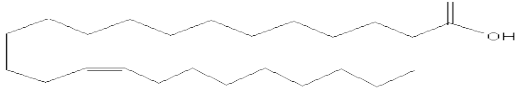
1.2.2.2. Ácidos Gordos Insaturados

A primeira ligação dupla de uma gordura insaturada ocorre geralmente entre os átomos C9 e C10. Nos polinsaturados, as ligações duplas tendem a ocorrer com um intervalo de três em três átomos de carbono, não sendo conjugadas. Destes, três séries importantes são designadas como $\omega 3$ (n3) e $\omega 6$ (n6) e $\omega 9$ (n9), uma nomenclatura que identifica o último átomo de carbono da ligação dupla, contado a partir do metilo terminal da cadeia. As ligações duplas têm naturalmente a configuração *cis*, responsável por exercer um ângulo de 30° na cadeia. Consequentemente, associados a reduzidas interações de *van der Waals*, os pontos de fusão dos ácidos gordos diminuem com o aumento do grau de insaturação destes. Assim, a fluidez dos lípidos contendo resíduos de ácidos gordos aumenta com o grau de insaturação, fenómeno com consequências importantes para as membranas biológicas ².

Na tabela (Tabela 2) seguinte estão representados os principais ácidos gordos insaturados.

Tabela 2 - Nomenclatura, estrutura e ponto de fusão dos ácidos gordos insaturados mais comuns (*Adaptado de IV*).

Nomenclatura Comum	Nomenclatura Sistemática	Estrutura	Ponto de Fusão (°C)
Palmitoleico C16:1n7c	9-Hexadecanóico		-0,5
Oleico C18:1n9c	9-Octadecanóico		12
Linoleico C18:2n6c	9,12-Octadecadiénico		-5
α -Linolénico C18:3n3c	9,12,15-Octadecatrienóico		-11
γ -Linolénico C18:3n6	6,9,12-Octadecatrienóico		-11
Araquidónico C20:4n6c	5,8,11,14-Eicosatetraenóico		-49,5

EPA C20:5n3c	5,8,11,14,17- Eicosapentaenóico		-53,8
DHA C22:6n3c	4,7,10,13,16,19- Docosahexaenóico		-44.1
Nervónico C24:1n9c	15-Tetracosanóico		42.3

O ácido gordo monoinsaturado mais importante da série n-9 é o ácido oleico (C18:1n9), descoberto em 1823 por M.E. Chevreul em gorduras animais, é especialmente abundante no azeite (50% -80% do total) e serve como precursor metabólico do ácido linoleico nas plantas. Outros ácidos gordos n-9 estão presentes na dieta mas não têm significado nutricional devido à sua baixa concentração nos alimentos.

Da série n-6, o mais representativo e essencial é o ácido linoleico (C18:2n6), isolado em 1844 a partir do óleo de linhaça, é principalmente encontrado em plantas (folhas, caules, frutas e nozes) ou nos seus subprodutos (óleos) e denominado essencial por ser o precursor dos outros ácidos gordos da sua série e pela incapacidade de ser produzido pelo organismo dos animais. O ácido araquidónico (20:4n-6) é um componente importante dos fosfolípidos de membrana, dando origem a uma grande quantidade de moléculas bioactivas (eicosanóides dos quais prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), está pobremente representado em plantas, naturalmente presente em algumas microalgas, fungos e tecidos animais ⁶.

O ácido gordo α -linolénico (C18:3n3c), também essencial, é o n-3 com maior relevância por ser o precursor de todos os n-3, sendo a sua fonte dietética mais comum o óleo de linhaça. Os óleos de peixe contêm gorduras polinsaturadas (PUFA) de cadeia longa como o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n3) e o ácido docosahexaenóico (DHA 22:6 n3) ⁸.

▪ Ácidos Gordos *Trans*

Os ácidos gordos *trans* contêm pelo menos uma ligação dupla na configuração *trans*. A diferença entre estas duas conformações *cis* e *trans* reside na posição dos dois átomos de hidrogénio quer no mesmo lado do plano da ligação dupla (forma *cis*) ou em ambos os lados (forma *trans*), o que, por sua vez, origina uma cadeia mais estendida

afectando as propriedades físicas do ácido gordo. Apresentam fluidez reduzida quando comparada aos ácidos gordos *cis* ⁸.

Há evidências consistentes de que os ácidos gordos *trans* estão relacionados a efeitos adversos para a saúde, particularmente no perfil de lipoproteínas sanguíneas, doenças cardíacas, cancro e diabetes. Assim, a Comissão Europeia determinou que informações sobre a presença de gorduras *trans* na dieta geral da população da UE devem ser estudadas e conhecidas, a fim de implementar medidas adequadas para sua redução ⁹.

- **Ácido Linoleico Conjugado (CLA do inglês Conjugated Linoleic Acid)**

CLA é um termo colectivo para um grupo de isómeros geométricos e posicionais do ácido linoleico no qual as ligações duplas *trans/cis* são conjugadas; isto é, as ligações duplas ocorrem separadas apenas por um carbono. Pelo menos nove isómeros diferentes de CLA foram relatados como componentes nos alimentos, mas apenas os isómeros *cis*-9 *trans*-11 e *trans*-10 *cis*-12, possuem actividade biológica. Há evidências limitadas que sugerem que o isómero *trans*-10 *cis*-12 reduz a absorção de lípidos pelo adipócito e que o isómero *cis*-9 *trans*-11 é activo na inibição da carcinogénese. Da mesma forma, existem dados limitados para comprovar que os isómeros *cis*-9 *trans*-11 e *trans*-10 *cis*-12 inibem a aterogénese. São encontrados principalmente em alimentos derivados de ruminantes, como produtos lácteos e carne bovina ¹⁰.

1.2.3. Composição de ácidos gordos nos alimentos

De acordo com o Regulamento (EU) Nº1169/2011 do Parlamento Europeu relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, o valor energético, a quantidade de lípidos, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, proteínas e sal têm de ser referidos de forma legível no rótulo dos produtos

¹¹.

1.2.3.1. Óleos Vegetais

O óleo de palma é extraído da polpa do fruto da palmeira (*Elaeis guineensis*). A polpa é caracterizada pela prevalência do ácido saturado de cadeia longa palmítico e monoinsaturado oleico. O óleo de soja é extraído das sementes da leguminosa *Glycine soya*. A soja é rica em ácidos gordos insaturados, particularmente no ácido linoleico (50%-62%), oleico (17%-26%) e posteriormente linolénico (4% -10%), possuindo baixa concentração em ácidos gordos saturados. O óleo de girassol é extraído das sementes do girassol (*Helianthus annuus*), sendo caracterizado pela contribuição do ácido linoleico (mais de 60%) e posteriormente oleico (15-25%). O amendoim (*Arachis hipogéia*) é caracterizado pela presença dominante de dois ácidos gordos, oleico (35-66%) e linoleico (14-41%). O azeite é extraído da polpa do fruto da Oliveira (*Olea europea*) e contém alta percentagem de ácido oleico (53% a 80%). O óleo de côco é extraído do fruto da árvore de côco (*Cocos nucifera*). Na sua composição, contém maioritariamente ácido láurico (40-54%) e mirístico (15-23%). O milho (*Zea mays*, *Poaceae*) além de proporcionar uma farinha rica em amido e proteínas tem como subproduto o seu óleo com alto teor de ácido oleico (24-32 %) e linoleico (entre 55% e 62%) (Tabela 3) ⁶.

A margarina é actualmente fabricada a partir de óleos vegetais, mas o processo original pressupunha uma emulsão de leite com gordura de bovino, tendo este substituto da manteiga sido patenteado em 1872 por Hippolyte Mège Mouries. Actualmente, o processo de conversão de gorduras líquidas (óleos vegetais) em gorduras plásticas, como a margarina, pode acontecer por três métodos distintos, a hidrogenação, a interesterificação e o fracionamento. O processo de hidrogenação consiste principalmente na reacção de óleos vegetais com hidrogénio na presença de um catalisador (níquel ou paládio) sob condições físicas estritamente controladas com a finalidade de diminuir o grau de insaturação dos ácidos gordos, permitindo o aumento

do ponto de fusão destes, endurecendo assim o produto até à plasticidade e estabilidade pretendida (Figura 6).

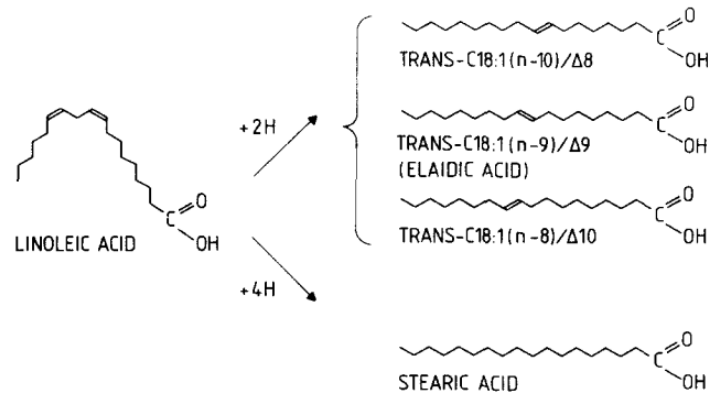


Figura 6 - Estrutura do ácido linoleico e de alguns produtos de hidrogenação (Adaptado de ¹²).

O maior inconveniente deste tipo de processamento encontra-se na formação de ácidos gordos *trans*, recentemente relacionados com problemas nutricionais e patológicos. No entanto, os processos de fabrico foram aperfeiçoados gradualmente para garantir o consumo de uma quantidade mínima destes compostos, geralmente presentes em concentrações inferiores 2 g por 100 g de produto.

A composição dos ácidos gordos da margarina depende muito dos óleos vegetais empregues no seu fabrico. Deve notar-se que a concentração dos ácidos gordos polinsaturados (aproximadamente 14,3% do ácido linoleico e linolénico) é bastante inferior à dos óleos vegetais originais, sendo esta diferença resultado do processo de hidrogenação.

Nas últimas décadas, a fórmula industrial destes produtos tem sofrido bastantes alterações, surgiram nomeadamente margarinas enriquecidas com ácidos gordos n-3, n-9 e fitoesteróis. Estas especificações visam prevenir ou lutar contra doenças cardiovasculares ou combater a absorção intestinal do colesterol, tendo sido estes produtos autorizados pela Comissão Europeia em 2000 ¹².

1.2.3.2. Gorduras Animais

A banha é originária principalmente da gordura subcutânea do porco e obtida após aquecimento das várias fontes de tecido adiposo (pele, gordura visceral). Em alguns países, pode ser hidrogenada para melhorar a estabilidade à temperatura

ambiente e evitar oxidações. Também é frequentemente tratada com agentes de branqueamento e desodorizantes, com emulsionantes e antioxidantes. A composição de ácidos gordos varia muito de acordo com a dieta animal, embora em geral esteja associada a maior percentagem de ácidos gordos saturados (C16:0) e monoinsaturados (C18:1n9).

A composição dos óleos de peixe é muito dependente das espécies, do período e da área de captura. Peixes como o arenque (*Clupea harengus*) e anchova (*Engraulis spp.*, *Anchoa spp.*) são as espécies geralmente utilizadas para preparar estes óleos. Contêm globalmente na sua composição ácidos gordos polinsaturados da série n-3 (EPA C20:5n-3 e DHA C22:6n-3).

A manteiga é um produto gordo obtido principalmente a partir do leite de vaca, 25 L de leite fornecem aproximadamente 1 kg de manteiga. É a gordura natural mais complexa, uma vez que podem ser caracterizados mais de 400 ácidos gordos, sendo mais de 40% saturados. Com alta percentagem de ácidos gordos de cadeia curta e média, incluindo o ácido butírico (C4:0) e láurico (C12:0). Contém naturalmente colesterol (valor máximo de 350 mg/100 g), vitaminas A (0,7 mg/100 g), E (3 mg/100 g) e vitamina D (1 mg/100 g). O β -caroteno é adicionado por alguns fabricantes para garantir uma cor amarela mais atraente ⁶.

Tabela 3 - Composição de gordura total (GT), ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados de Óleos e Gorduras (Fonte: Tabela da Composição de Alimentos Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2007).

	GT (g/100g)	Saturados (g/100g)	Monoinsaturados (g/100g)	Polinsaturados (g/100g)
Palma	100	49,3	37	9,3
Soja	98,5	14,7	22,1	59,1
Girassol	99,5	11,6	22,3	62,2
Amendoim	98,5	16,6	49,5	25,9
Azeite	99,9	15,1	77,2	6,9
Côco	99,6	82,5	6,3	1,7
Milho	99,5	13,3	25,1	53,5
Margarina 80%	80,0	40,2	17,2	22,3
Banha Porco	99,5	26,3	58,6	10,4
Manteiga	83,0	46,3	18,9	2,4
Óleo Peixe	100	29,9	33,8	31,9

1.2.3.3. Leite e Produtos Lácteos

Durante vários séculos, o leite e os seus derivados têm desempenhado um papel fulcral na alimentação humana principalmente devido ao seu alto valor nutricional definido pela sua variada composição química. O leite é considerado uma boa fonte de proteínas, gordura facilmente digerível, lactose, minerais (cálcio) e uma série de vitaminas e outros compostos bioativos. Este grupo de alimentos fornece à dieta humana aproximadamente 15-25% da gordura consumida. O teor médio de gordura no leite bovino gordo é de 3,5%, dependendo da raça, nutrição e período de lactação. Dos ácidos gordos saturados contém principalmente ácido palmítico (C16:0) e como monoinsaturado ácido oleico (C18:1n-9) ¹³.

Tipicamente, a gordura do leite consiste em 2,0 g/100 g de ácidos saturados, 0,8 g/100 g de monoinsaturados e 0,1 g/100 g de polinsaturados, embora devido ao fracionamento durante o processo de fabrico de outros lacticínios a percentagem destes ácidos gordos altera de acordo com o produto final (Tabela 4) ¹⁴.

As características sensoriais são bastante influentes na preferência alimentar, sendo ultimamente determinante avaliar o impacto da composição dos ácidos gordos nos atributos sensoriais (textura e sabor) do leite e derivados. Por exemplo, com o aumento do conteúdo de saturados existe um incremento do ponto de fusão dos produtos lácteos, afectando a textura destes, particularmente dos queijos ¹⁵.

Tabela 4 - Composição de gordura total (GT), ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados de Leite e produtos Lácteos (Fonte: Tabela da Composição de Alimentos Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2007).

	GT (g/100g)	Saturados (g/100g)	Monoinsaturados (g/100g)	Polinsaturados (g/100g)
Leite Vaca UHT Magro	0,2	0,1	0,1	0,0
Leite Vaca UHT MG	1,6	0,9	0,4	0,0
Leite Vaca UHT Gordo	3,5	2,0	0,8	0,1
Nata Pasteurizada*	34,0	19,0	8,0	1,0
Queijo Flamengo 45%	23,4	12,6	6,0	0,9
Requeijão	11,3	6,1	2,9	0,4
Iogurte Sólido Natural**	1,8	1,0	0,4	0,1
Iogurte Líquido**	1,4	0,8	0,3	0,0
Gelado de Leite	10,9	6,1	2,5	0,3

Nota: MG - Meio Gordo

*para bater

**meio gordo

1.2.3.4. Frutos Gordos e Amiláceos

Frutos secos como o pinhão, amêndoa, amendoim, avelã, noz e pistácio são caracterizados por valores elevados de ácidos gordos mono e polinsaturados, especialmente oleico (C18:1n-9) e linoleico (C18:2n-6). Outros frutos como o cacau, côco, azeitona e abacate são considerados gordos, tendo os dois primeiros maior teor de ácidos gordos saturados dos quais palmítico e esteárico (C16:0 e C18:0, respetivamente), ácido láurico e mirístico (C12:0 e C14:0, respetivamente). A azeitona e abacate têm maior teor de monoinsaturados, maioritariamente ácido oleico (C18:1n-9).

Tabela 5 - Composição de gordura total (GT), ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados de Frutos Gordos e Amiláceos (Fonte: Tabela da Composição de Alimentos Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2007).

	GT (g/100g)	Saturados (g/100g)	Monoinsaturados (g/100g)	Polinsaturados (g/100g)
Pinhão	51,7	3,5	15,0	31,0
Amêndoa	56,0	4,7	34,5	14,3
Amendoim	47,7	8,5	21,8	14,8
Avelã	66,3	4,9	52,2	6,2
Noz	67,5	5,4	15,0	47,0
Pistácio	53,0	6,7	35,7	8,0
Cacau em pó	23,4	13,8	7,8	0,6
Côco ralado	62,0	53,3	4,1	1,1
Azeitona	18,5	2,9	9,6	2,2
Abacate	10,5	2,2	6,5	1,2

1.2.3.5. Carne, Pescado e Ovos

A quantidade de lípidos incluídos nos tecidos musculares dos mamíferos e aves depende da espécie, dos músculos analisados e também em grande parte da sua dieta. As diferenças entre espécies são parcialmente explicadas pelo processo digestivo das mesmas. Apesar dessa variabilidade, os valores lipídicos médios das diversas localizações anatómicas correspondentes às peças mais consumidas são dados na Tabela 6. A carne de porco tem proporções elevadas de ácidos gordos polinsaturados, nomeadamente ácido linoleico (18:2n-6) em relação aos ruminantes, uma vez que nestes, estes ácidos gordos são degradados em ácidos gordos monoinsaturados e saturados no rúmen por hidrogenação bacteriana e apenas 10% fica disponível para incorporação nos tecidos ¹⁶.

Fontes de EPA (C20:5n3c) e DHA (C22:6n3c) estão presentes principalmente em peixes como o salmão e sardinha e nos ovos de galinha ⁶.

Tabela 6 - Composição de gordura total (GT), ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados de Carne, Pescado e Ovos (Fonte: Tabela da Composição de Alimentos Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 2007).

	GT (g/100g)	Saturados (g/100g)	Monoinsaturados (g/100g)	Polinsaturados (g/100g)
Costeleta Vitela	4,5	1,9	2,2	0,2
Lombo Vitela	7,6	3,2	3,3	0,3
Costeleta Porco	15,8	5,4	5,3	2,6
Lombo Porco	4,7	1,6	1,6	0,8
Peito Frango*	1,2	0,3	0,4	0,2
Perna Frango*	2,6	0,6	0,9	0,5
Salmão	21,9	4,2	10,0	5,1
Sardinha	16,4	4,7	4,0	5,6
Ovo de Galinha	10,8	2,7	3,9	2,1

*sem pele

1.2.4. Consumo, implicações nutricionais e patológicas

Em Portugal, a disponibilidade diária *per capita* média de gordura nos produtos alimentares de 2012 a 2016 totaliza 149,3 g/hab/dia (152,8 g/hab/dia em 2016). Relativamente às fontes das disponibilidades diárias *per capita* deste macronutriente, 61,0% resultaram, em 2016, da contribuição dos óleos e gorduras, com um aumento de 2,5% entre 2012 e 2016. Com menor expressão, as carnes, pescado e ovos contribuíram com 20,5% para o total de gorduras e o leite e produtos lácteos com 9,0%, ambos com variações positivas, entre 2012 e 2016, respetivamente 6,8% e 0,7%.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, e considerando um padrão alimentar saudável, os hidratos de carbono devem contribuir com 55-75% para o aporte calórico das disponibilidades alimentares, as gorduras com 15-30% e as proteínas com 10-15%¹⁷.

Tendo em consideração o consumo diário de gordura *per capita*, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO do inglês *Food and Agriculture Organization*) determinou que este é excedido com especial destaque nos países ocidentais (Figura 7), especialmente associados a impactos nutricionais e patológicos advindos⁶.

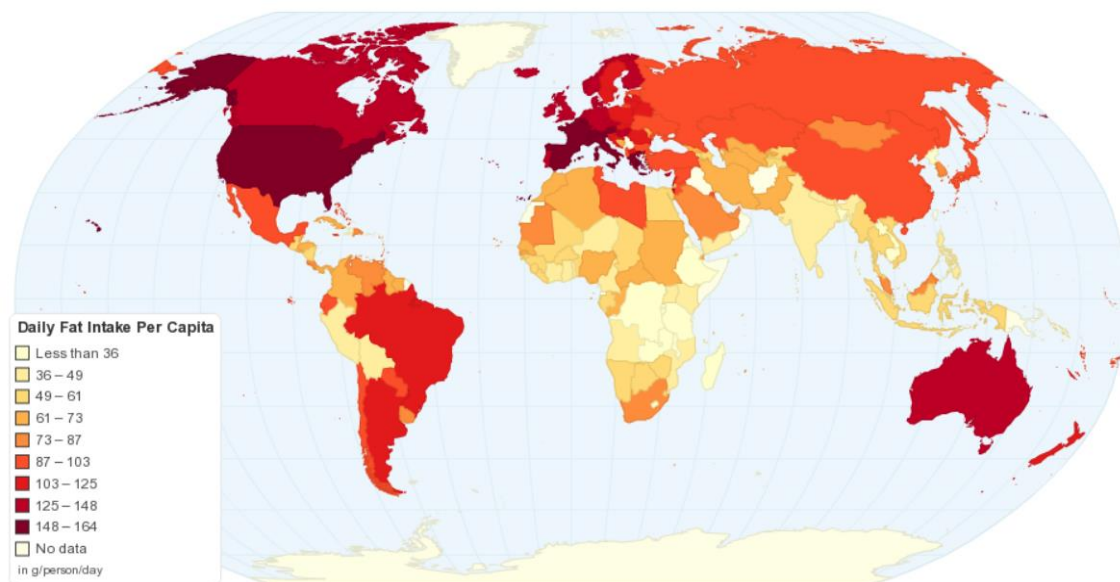


Figura 7- Consumo de gordura diária *per capita* (g/hab/dia) no Mundo, dados de 2005-2007¹⁸.

Tornou-se gradualmente evidente que não é a quantidade de gordura consumida, mas a sua qualidade que deveria ser tomada em consideração quanto à analogia às patologias. O risco de doenças cardiovasculares é amplamente relacionado com fatores ambientais modificáveis, incluindo a dieta. Por exemplo, o excesso de

consumo de ácidos gordos *trans* induz o aumento dos níveis plasmáticos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), enquanto diminui níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Por sua vez, os ácidos gordos, principalmente o ácido eladílico, modelam a susceptibilidade ao stress oxidativo que desencadeia processos inflamatórios com impacto no desenvolvimento de doenças como aterosclerose ¹⁸.

Reduzir o consumo de ácidos gordos saturados é um pilar das recomendações dietéticas nacionais e internacionais para diminuir o risco de doenças cardiovasculares. A Organização Mundial da Saúde (WHO do inglês *World Health Organization*) recomenda consumir menos de 10% da ingestão total de energia de ácidos gordos saturados. A substituição de ácidos gordos saturados por polinsaturados diminui o risco da ocorrência de doenças cardiovasculares e metabólicas. Os nutricionistas têm em consideração as últimas observações e recomendam uma redução do consumo de alimentos ricos em ácidos saturados, especialmente o ácido palmítico, para prevenir a resistência à insulina e, portanto, diabetes tipo II¹⁹.

Em 1975 estudos epidemiológicos relacionaram, em 23 países, o consumo de gordura com o cancro do cólon, mama e ovário. Esta evidência, segundo o Instituto Americano de Investigação do Cancro (*American Institute for Cancer Research*) é de clareza limitada pois a variabilidade nas investigações epidemiológicas e a variedade de espécies de ácidos gordos incluídos nas diferentes dietas não permitem concluir que os lípidos ingeridos têm efeito no cancro.

O consumo adequado de ácidos gordos ómega 3 e 6 podem evitar as doenças cardiovasculares, cancros e doenças inflamatórias que caracterizam as populações dos países desenvolvidos. A suplementação dietética com n-6 ácido γ -linolénico foi proposta para reduzir a hiperproliferação epidérmica em indivíduos com pele seca e dermatite atópica. Muitos estudos clínicos levaram à aceitação de que os ácidos gordos n-3, nomeadamente EPA e DHA ajudam na proteção ou alívio de doenças envolvendo processos inflamatórios. Este último ácido gordo exerce um papel fundamental na estrutura e função do cérebro e ocular, ao que se estabelece uma ingestão mínima de 0,32% do consumo total de ácidos gordos ⁶.

1.2.5. Biossíntese e Metabolismo de Ácidos Gordos

A molécula acetil-coA é a principal precursora para a biossíntese de ácidos gordos, sendo produzida na mitocôndria através da descarboxilação oxidativa do piruvato. Quando a demanda de ATP é baixa, ou seja, a oxidação de acetil-coA através do ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa é mínima, a acetil-coA mitocondrial pode ser armazenada para a síntese de ácidos gordos. Na síntese de ácidos gordos, a acetil-coA mitocondrial é enviada para o citosol e activada a malonil-coA pela acção da acetil-coA carboxilase. Posteriormente, a fase de alongamento e síntese começa com a formação de acetil-ACP (*Acyl Carrier Protein*) e malonil-ACP que, por sua vez condensam dando origem a acetoacetil-ACP contendo quatro carbonos. O grupo ceto da acetoacetil-ACP é então reduzido, dependente de NADPH, formando hidroxibutiril-ACP, depois este é desidratado, formando Δ^2 -enoil-ACP, e novamente reduzido, formando butiril-ACP, completando o primeiro ciclo de elongação. Assim, partindo de acetil-coA, em cada ciclo catalítico (de 6 passos) são acrescentados 2 carbonos e, ao fim de 7 ciclos, dá-se uma hidrólise que liberta palmitato (C16). Em cada ciclo o dador dos 2 carbonos acrescentados é o malonil-coA e o carbono 2 do resíduo de malonilo liga-se ao carbono carboxílico do ácido gordo saturado intermediário (com sucessivamente 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 carbonos) que é substrato em cada ciclo (Figura 8) ¹.

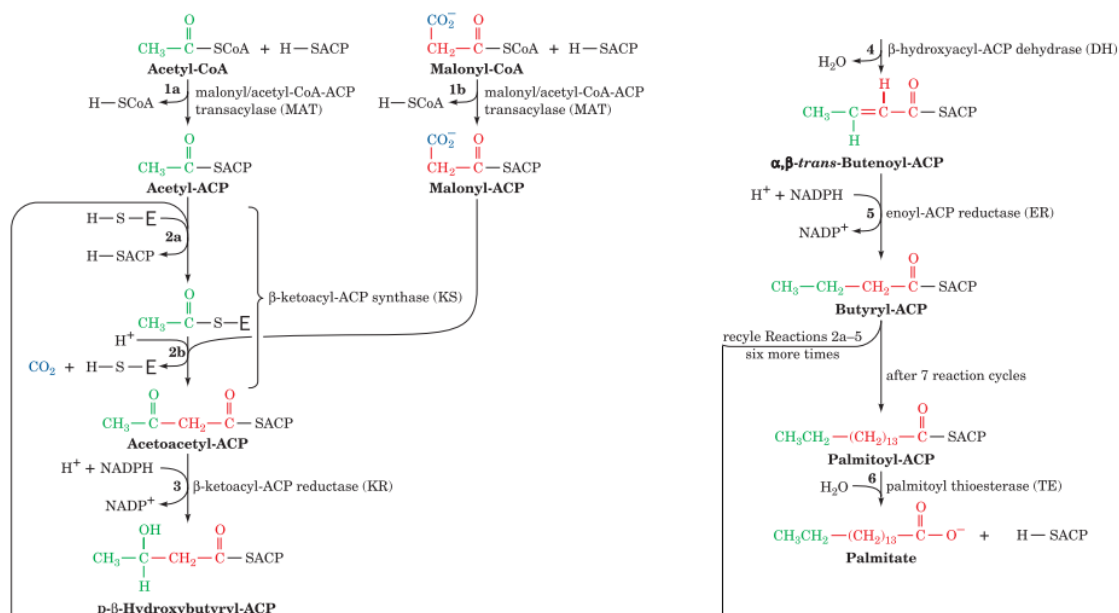


Figura 8 - Biossíntese do palmitato (C16:0).

O palmitato é convertido em ácidos gordos saturados e insaturados de cadeia longa através das ações de elongases e dessaturases. As elongases estão presentes

tanto na mitocôndria como no retículo endoplasmático. Os ácidos insaturados são produzidos por dessaturases terminais.

Os mamíferos contêm quatro dessaturases terminais designadas por Δ -9, Δ -6, Δ -5 e Δ -4. No entanto, uma vez que o ácido palmítico é o ácido gordo disponível mais curto em animais, as regras acima excluem, por exemplo, a formação da ligação dupla 12 do ácido linoleico, um precursor necessário de prostaglandinas e outros eicosanóides. Os ácidos linoleico e linolénico devem, conseqüentemente, ser obtidos na dieta a partir de plantas que possuam dessaturases Δ -12 e Δ -15 (Figura 9) ²⁰.

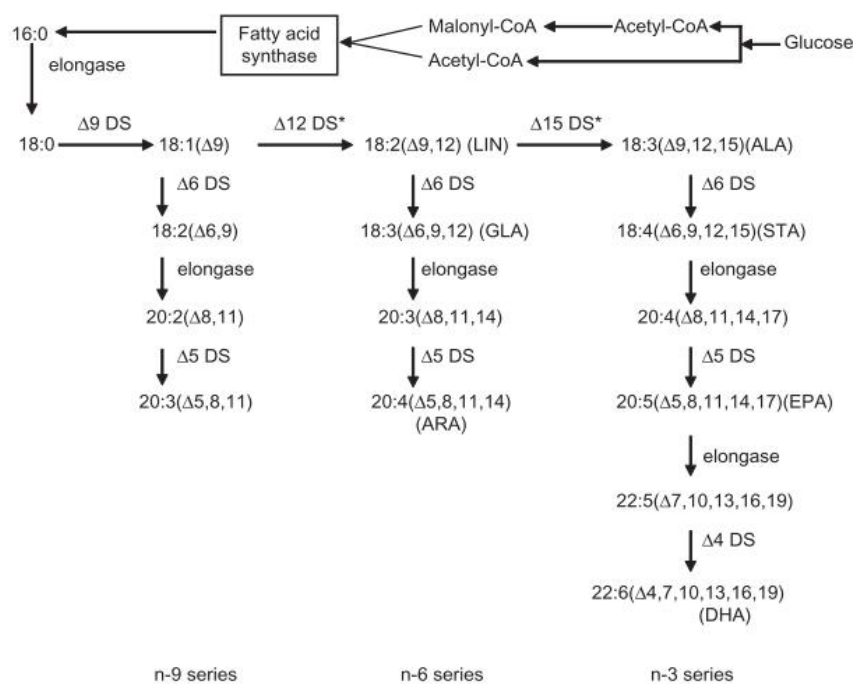


Figura 9 - Metabolismo de ácidos gordos das series n-9, n-6 e n-3.

Nota:* representa dessaturases que não estão presentes nos humanos e outros animais²⁰

Uma vez que os triglicerídeos são insolúveis em água e as enzimas digestivas solúveis, a digestão destes ocorre em interfaces semi-solúveis. A taxa de digestão depende, portanto, da área superficial da interface, que é grandemente aumentada pelos movimentos peristálticos do intestino combinados com a ação emulsificante dos ácidos biliares por serem anfipáticos e assim solubilizar os glóbulos gordos. Os ácidos biliares, derivados do colesterol, são sintetizados pelo fígado e secretados como conjugados de glicina ou taurina na vesícula biliar para armazenamento. A partir daí, são segregados no intestino delgado, onde a digestão lipídica e a absorção ocorrem principalmente.

A digestão e absorção de TAG são processos complexos e envolvem uma série de eventos físico-químicos. Após a ingestão, o primeiro passo digestivo é a

hidrólise na boca e no estômago, onde são hidrolisadas pelas lipases lingual e gástricas que hidrolisam preferencialmente a posição sn-3 dos TAGs para gerar ácidos gordos na sua forma livre (FFA do inglês *free fatty acids*), ácidos gordos não esterificados e 1,2-diacilgliceróis. Em adultos saudáveis, a lipólise de TAGs ocorre 10-30% no estômago.

O passo subsequente é mais uma quebra de TAG no duodeno, onde a lipase pancreática adere à superfície das gotículas de óleo pré-existentes, ou às que se formaram *in situ* ao interagir com a bilis adsorvida. A lipase pancreática hidrolisa preferencialmente a posição sn-1 e sn-3 dos TAGs, levando à formação de micelas contendo FFAs e 2-monoacilgliceróis (2-MAGs), Figura 10.

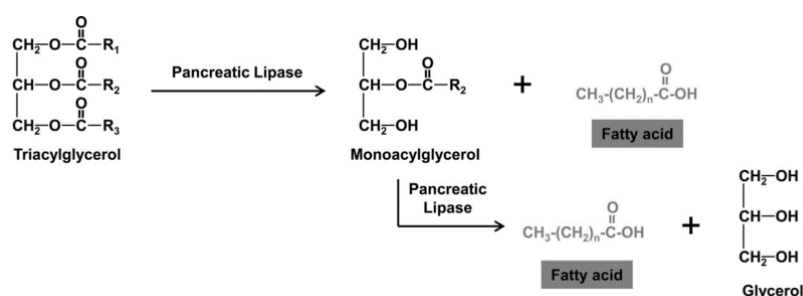


Figura 10 - Ação da lipase pancreática.

O terceiro passo envolve a solubilização e absorção pelos enterócitos onde os ácidos gordos formam complexos intestinais com uma proteína de ligação ao ácido gordo (FABP do inglês *fatty acid binding protein*), uma proteína citoplasmática que aumenta a solubilidade efetiva destas substâncias insolúveis em água e também protege a célula dos seus efeitos de detergente ²¹.

No último passo, os FFA de cadeia longa e 2-MAGs são transportados para o retículo endoplasmático dos enterócitos, onde são re-sintetizados em TAG. Estes TAGs são reciclados com colesterol, lipoproteínas e outros lípidos em quilomicrons que são distribuídos para diferentes células através do sistema linfático e depois para a circulação sistêmica. Em contrapartida, os FFAs de curta duração e de cadeia média são transportados ligados à albumina e deixam os enterócitos através da veia porta ²².

As lipoproteínas são partículas globulares formadas por micelas que consistem num núcleo apolar de triglicerídeos e ésteres de colesterol envolvidos por um revestimento anfifílico de proteína, fosfolípido e colesterol. Lipoproteínas conhecidas como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são sintetizados pelo fígado para transportar triglicerídeos e colesterol endógenos do fígado para os tecidos.

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) transportam o colesterol e outros lípidos dos tecidos de volta ao fígado (Figura 11) ⁶.

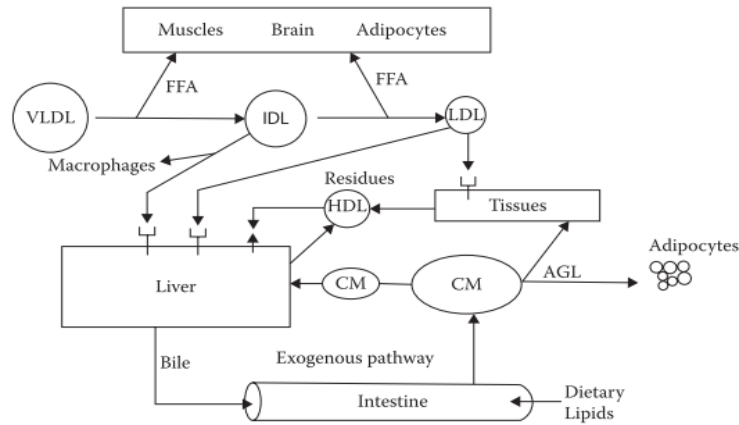


Figura 11 - Transporte de lipoproteínas, ácidos gordos livres (FFA) e quilomicrons (CM) no organismo.

1.2.6. Aplicações

Óleos e gorduras demonstram ser uma matéria-prima com potencial para a produção de biodiesel de baixo custo. O biodiesel é definido, de acordo com a Directiva 2003/30/CE, como éster metílico ou etílico (derivado de alquilésteres de ácidos gordos), obtido a partir de matérias-primas naturais e de fontes renováveis, como óleos vegetais (óleo de palma, soja, amendoim, girassol entre outros), gorduras animais (sebo de gordura animal, óleos de peixe entre outros) ou residuais. A sua utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores a diesel), para utilização como biocombustível, sem necessidade de modificação. Uma das utilizações actuais dos óleos usados é a sua incorporação como matéria-prima auxiliar na indústria de sabões, sendo que a principal vantagem deste tipo de utilização reside na poupança de matérias-primas virgens, com implicações óbvias económicas e ambientais ²³.

Os ésteres de açúcares formados a partir de ácidos gordos são surfactantes não iónicos, biodegradáveis e não irritáveis para a pele ou olhos, sendo atraentes para indústrias alimentares, farmacêuticas e cosméticas. Por exemplo, o *design* de ésteres de açúcares que se assemelham a triglicerídeos e actuam como gorduras não-calóricas torna os ésteres de açúcares de interesse para a indústria alimentar.

Embora os ácidos gordos na forma de sais alcalinos tenham sido provavelmente os primeiros componentes utilizados em produtos cosméticos e de higiene pessoal como sabões e subsequentemente estabilizadores de emulsão, o uso actual desses produtos é limitado devido a efeitos adversos na pele. No entanto, os derivados de ácidos gordos tais como álcoois, ésteres de ácidos gordos e surfactantes (catiónicos, não iónicos e aniónicos) são utilizados numa vasta gama de produtos cosméticos e de cuidados pessoais com um número cada vez maior de funções ²⁰.

Os óleos e as gorduras desempenham grande importância económica como produtos agrícolas sendo essenciais no comércio internacional. Além disso, contribuem grandemente para a palatabilidade, sabor e estrutura dos alimentos. O seu conteúdo em ácidos gordos e consequentes benefícios, nomeadamente dos n-3 e n-6, são de grande importância para a suplementação alimentar ^{24,25}.

1.2.7. Métodos de extração e análise utilizados

1.2.7.1. Extração

Os lípidos ocorrem nos tecidos em grande variedade de formas físicas, sendo muitas vezes parte de agregados em tecidos de armazenamento, dos quais são facilmente extraíveis. Por outro lado, lípidos constituintes de membranas surgem geralmente associados a proteínas e polissacarídeos, não sendo extraídos tão prontamente. Em geral, estas associações com os outros componentes da matriz do tecido não são covalentes. Genericamente, os lípidos estão ligados a outros elementos celulares por interações de van der Waals, por ligações de hidrogénio e iónicas. Por exemplo, as porções alifáticas hidrofóbicas dos lípidos interagem com as regiões apolares de aminoácidos, tais como valina, leucina e isoleucina. Os grupos hidroxilo, carboxilo e amino de moléculas lipídicas podem interagir mais fortemente com biopolímeros através de ligações de hidrogénio. Finalmente, as ligações mais fortes são iónicas entre grupos fosfato ou sulfato de lípidos e iões metálicos, que podem, por sua vez, estar ligados de forma semelhante a proteínas celulares ou polissacarídeos ²⁶.

A análise dos ácidos gordos em produtos alimentares baseia-se, frequentemente, em 4 etapas: Extração com hidrólise ácida, básica ou enzimática, seguida de extração com solventes orgânicos, metilação dos ácidos gordos e finalmente, análise quantitativa ou qualitativa.

A forma mais utilizada para garantir que todos os lípidos são extraídos envolve a utilização de solventes orgânicos. Lípidos como triglicerídeos são muito solúveis em solventes como hexano ou tolueno e em solventes mais polares tais como clorofórmio ou éteres.

O teor de gordura é determinado frequentemente por métodos de extração com solventes (Soxhlet, Goldfish, Mojonnier, Bligh e Dyer ou Folch *et al.*), mas também pode ser definido por métodos de extração sem recorrer a solventes (Babcock, Gerber) e por métodos instrumentais (infravermelho, densidade, absorção de raios X). O método de escolha depende de uma variedade de factores, incluindo a natureza da amostra (seca ou húmida), o propósito da análise (rotulagem oficial ou controlo de qualidade rápido) e instrumentação disponível ²⁷.

A extração é, geralmente, líquido-líquido, separando-se duas fases: orgânica contendo os lípidos totais e uma fase rica em água contendo outros compostos como açúcares e proteínas. A mistura de solventes mais utilizada é clorofórmio-metanol, descrita pela primeira vez há mais de 50 anos por Folch *et al.* e Bligh e Dyer.

Procedimentos Bligh e Dyer ou Folch *et al.* requerem grandes volumes de solventes, enquanto extrações automáticas como Soxhlet ou Goldfisch não têm esta desvantagem embora sejam mais lentas. Nas extrações automáticas o solvente entra em contacto com a matriz alimentar seguida da evaporação e sucessiva condensação do solvente. Este processo sucessivo e intermitente da amostra em contacto com um solvente orgânico devido à evaporação e condensação fornece uma constante renovação do solvente, permitindo uma extração em grande quantidade da fase lipídica sem recorrer à sua filtração.

Várias modificações e consequentes variantes destes procedimentos surgiram ao longo dos anos, entre eles, o uso de ultra-sons, microondas, calor ou pressão são utilizados para melhorar a eficiência da recuperação lipídica de vários tecidos ²⁸.

Diferentes matrizes exigem modificações nos processos de extração devido às interações moleculares acima referidas. Por exemplo, para o tratamento de leite e derivados é usualmente aplicado o método Rose-Gottlieb, onde a amostra é tratada com etanol para precipitar proteínas (caseína) associadas e amónia para dissolvê-las e, deste modo, extrair os lípidos posteriormente com éter dietílico e éter de petróleo, procedimento ISO 14156:2001 ²⁹.

Com a evolução biotecnológica surgem novos desafios que tornam a hidrólise e extração processos complexos. Por exemplo, a indústria da panificação recorre frequentemente à utilização de emulsionantes como ésteres monoacetil tartáricos e diacetil tartáricos (E472e) para obter produtos mais macios e com maior volume. A hélice de amido é estabilizada com a inclusão de emulsionantes, formando-se complexos amido-emulsionante. O encapsulamento de lípidos nos alimentos tornou-se recorrente com a utilização de ácidos gordos principalmente da série n-3 em nano-complexos de beta-lactoglobulina e pectina sobretudo com a finalidade de evitar a oxidação do produto, aumentando o tempo de vida útil e o seu potencial nutritivo ³⁰.

Deve-se ter em consideração a dificuldade na completa recuperação de cada classe lipídica por qualquer método de extração, podendo levar a resultados pouco consistentes. Para evitar tais problemas, padrões internos são comumente adicionados durante o processo de extração para a quantificação de diferentes classes lipídicas.

1.2.7.2. Preparação de derivados de ácidos gordos

Com a finalidade de analisar os ácidos gordos componentes, é necessário preparar derivados de ácidos gordos, usualmente ésteres metílicos devido à dificuldade

em evaporar ácidos gordos e à sua baixa resposta FID para análises que requerem cromatografia gasosa ²⁶.

As reações de derivatização são usualmente catalizadas em meio ácido ou básico, podendo também ocorrer na presença de diazometano ou outros catalisadores. Tais reações, geralmente na presença de metanol, são denominadas de metilação (transesterificação ou esterificação), Figura 12 ³¹.

Nas metilações em meio ácido o catalisador mais utilizado é o trifluoreto de boro em metanol. A amostra contendo catalisador e ácido é geralmente aquecida sob refluxo por duas horas ou mantida a temperaturas superiores num tubo por menos tempo. As reações de derivatização em meio básico tendem a utilizar hidróxido de potássio.

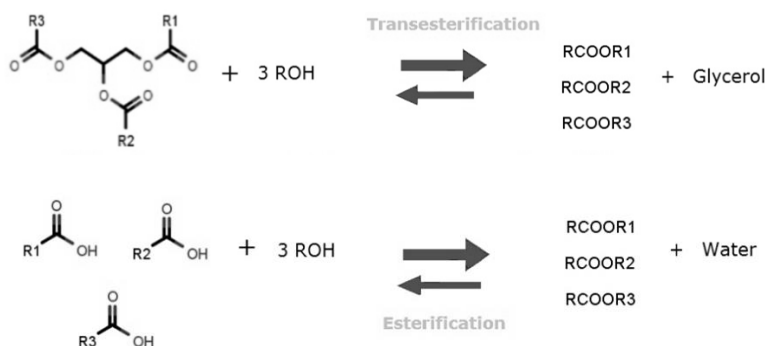


Figura 12 – Reações de transesterificação de TG e de esterificação de ácidos gordos com a formação de Free Acids Methyl Esters.

Os métodos catalisados por ácido podem ser favoráveis uma vez que são menos susceptíveis a pequenas quantidades de água. No entanto, existe o perigo de que contaminantes não lipídicos também possam interferir com análises as cromatográficas.

Não há necessidade de hidrolisar lípidos para obter os ácidos livres previamente à preparação dos ésteres, dado que a maioria dos lípidos pode ser transesterificada diretamente, embora alguns métodos aprovados insistam nesse passo

³¹.

1.2.7.3. Métodos Analíticos Utilizados

São necessários métodos precisos e sensíveis para a quantificação de ácidos gordos, várias metodologias como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectroscopia de infra-vermelho, electroforese capilar e cromatografia gasosa (CG)

podem ser utilizadas, sendo a última técnica amplamente utilizada para a análise de ácidos gordos ³².

A cromatografia líquida de alta eficiência é a ferramenta mais utilizada para a análise de produtos farmacêuticos, mas não é tão eficazmente aplicada à análise de ácidos gordos devido à ausência de cromóforos ou grupos funcionais fluorescentes. Como resultado, a maioria dos métodos de HPLC na literatura exige um processo de derivatização anterior à análise ³³.

1.3. Cromatografia Gasosa

Nas últimas décadas a preferência do consumidor tende a favorecer um padrão de vida saudável e a prevalência de produtos palatáveis com alto valor nutricional e de qualidade. Alimentos com qualidade pressupõem sempre segurança, factor determinante regido por padrões legais de acordo com riscos de saúde, ambientais e éticos. O impacto relacionado com o sabor, aroma e aparência também é determinante para o consumidor. Produtos finais, semi-finais e matérias-primas requerem controlo analítico para garantir requisitos de qualidade com elevado grau de confiança. A cromatografia gasosa, graças à sua flexibilidade, sensibilidade e robustez pode ser adoptada com sucesso para vários processos analíticos, dos quais ³⁴:

- Caracterização aromática dos alimentos;
- Estudos de composição e autenticidade;
- Determinação qualitativa e quantitativa de compostos voláteis de matrizes;
- Análise da gordura e caracterização de ácidos gordos, triglicerídeos e esteróis;
- Determinação de contaminantes (pesticidas, fármacos, produtos de migração de embalagens, contaminantes ambientais como bifenilos policlorados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos).



Figura 13 - Cromatógrafo gasoso (Adaptado de Agilent GC System).

Na cromatografia gasosa, os componentes da amostra vaporizada são separados em consequência da sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte, e, em contraste com outros métodos cromatográficos a fase móvel não interage com o analito. Na cromatografia gás-líquido a fase estacionária é

um líquido não volátil ligado à coluna, embora na cromatografia gás-sólido o analito é absorvido directamente para as partículas da fase estacionária. Seringas calibradas são empregues para a injeção de amostras líquidas por meio de diafragmas ou septos de silicone para uma porta aquecida localizada na cabeça da coluna. A porta é mantida a cerca de 50°C acima do ponto de ebulição do componente menos volátil da amostra, onde evapora e é arrastada para a coluna pelo gás (He, N₂, ou H₂), ocorrendo a separação dos analitos e consequente deteção, cuja resposta é dada pelo computador (Figura 14). A coluna deve ser mantida quente para fornecer pressão de vapor suficiente para que os analitos sejam eluídos num tempo razoável e o detector deve ser mantido a uma temperatura superior à da coluna para que todos os analitos se mantenham gasosos ³⁵.

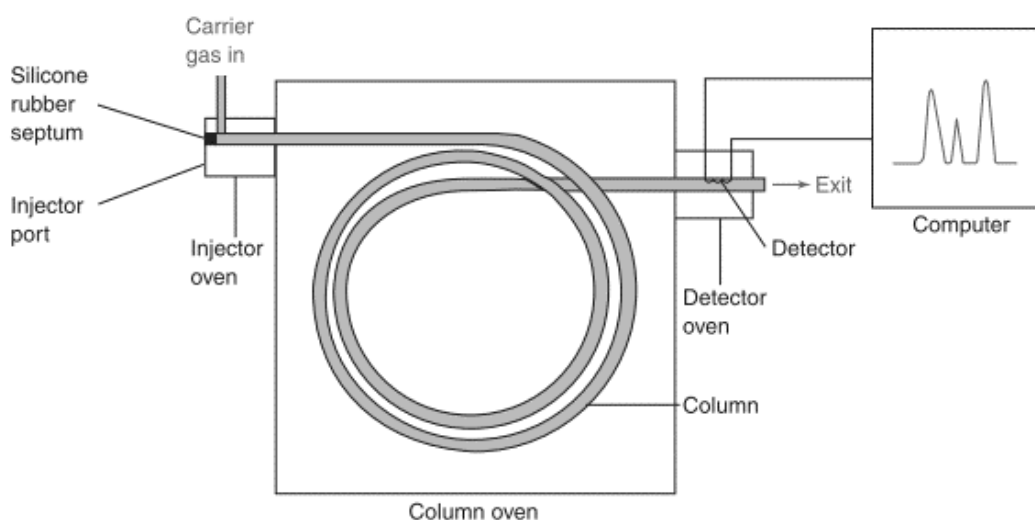


Figura 14 - Diagrama esquemático de um cromatógrafo gasoso.

Existem dois tipos gerais de colunas em cromatografia gasosa: colunas empacotadas e colunas tubulares abertas. Estudos pioneiros realizados em CG, no início de 1950, foram em colunas empacotadas nas quais a fase estacionária era constituída por um filme fino de líquido retido por adsorção na superfície de um suporte sólido inerte finamente dividido. A partir de estudos teóricos feitos durante esse período inicial, tornou-se aparente que as colunas não empacotadas com diâmetro de poucos décimos de milímetro poderiam proporcionar melhor separação do que aquelas obtidas com colunas empacotadas. Assim, as colunas tubulares abertas estão associadas a uma maior resolução, menor tempo de análise e maior sensibilidade ³⁵.

As colunas tubulares abertas são de três tipos básicos (Figura 15): colunas tubulares abertas de parede recoberta (WCOT do inglês *wall-coated open tubular*), colunas tubulares abertas revestidas com suporte SCOT (do inglês *support-coated open tubular*) e colunas tubulares abertas de camada porosa PLOT (do inglês *porous layer*

open tubular). As colunas de parede recoberta são simplesmente tubos capilares recobertos com uma fina camada de fase estacionária líquida. Nas colunas revestidas com suporte a fase estacionária líquida está ligada a um suporte sólido e nas colunas PLOT uma fase estacionária sólida está ligada à coluna. Geralmente, a eficiência de uma coluna SCOT é menor que uma coluna WCOT ³⁵.

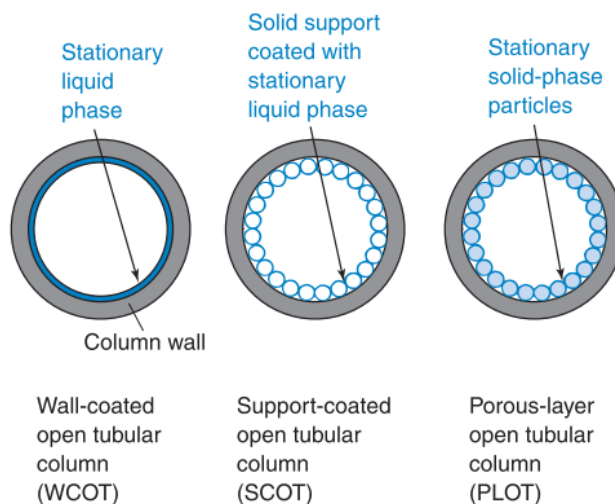


Figura 15 - Corte transversal das colunas WCOT, SCOT e PLOT.

A maioria das análises utiliza colunas tubulares abertas de sílica fundida (SiO_2) (FSOT do inglês *fused-silica open tubular*) revestidas com poliimida capaz de suportar temperaturas de 350°C . Estas colunas são bastante flexíveis podendo ser enroladas em bobinas (15-100 m de comprimento) e oferecem muitas vantagens como resistência física e pouca reatividade em relação aos componentes da amostra (Figura 16) ³⁶.

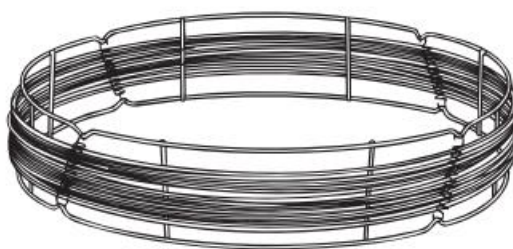


Figura 16 - Coluna tubular aberta de sílica fundida.

As fases líquidas para a análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos em CG são normalmente polares, onde os ácidos gordos saturados são eluídos precedentemente aos insaturados do mesmo comprimento de cadeia, enquanto o inverso é aplicado para as fases apolares.

As fases estacionárias polares são geralmente polisiloxanos que contêm diferentes grupos substituintes: fenil (C_6H_5), cianopropil ($\text{C}_3\text{H}_6\text{CN}$) e trifluoropropil ($\text{C}_3\text{H}_6\text{CF}_3$) e podem ser classificadas de acordo com o seu grau de polaridade. Na

prática actual existem essencialmente dois tipos principais que devem ser considerados: de baixa a média como Carbowax™ BPX70™, SP-2340™ e aqueles de alta polaridade como CP-Sil 88™, BPX70™ ou SP-2560™ (100% bis-cianopropil polisiloxano) - cromatograma ilustrado na Figura 17. Com colunas de maior polaridade obtém-se excelente resolução, especialmente de isómeros posicionais ou geométricos. Os fabricantes tendem a dar proeminência às fases de alta polaridade e recomendá-las para análises de ácidos gordos de rotina ²⁶.

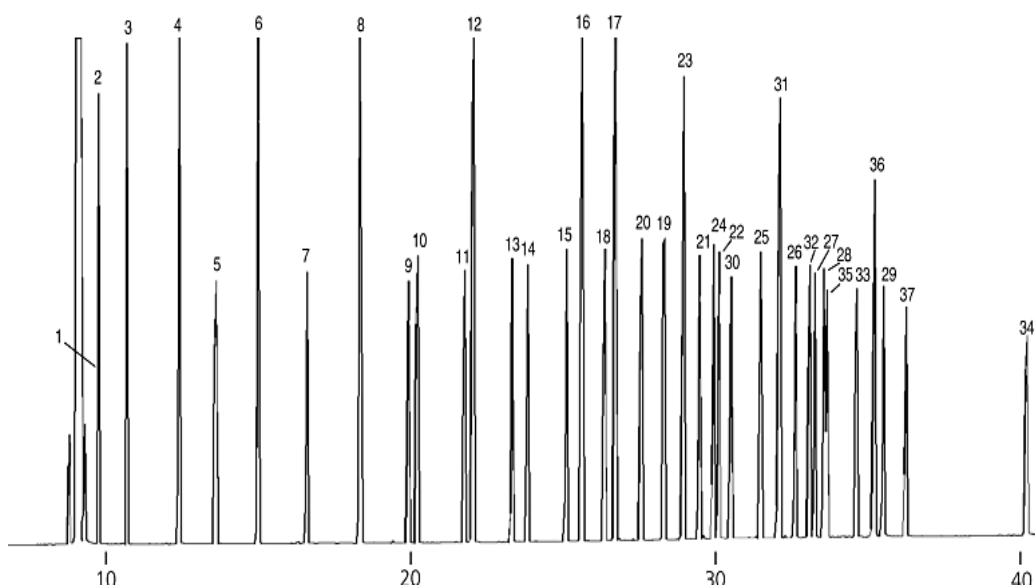


Figura 17 - Cromatograma do padrão relativo a 37 ácidos gordos em coluna SP-2560™ (adaptado de Buletin 907 Supelco)⁴⁷.

Tabela 7 - Composição do padrão C37. (adaptado de Buletin 907 Supelco)⁴⁷.

Peak ID ⁴⁷	Component (acid methyl esters)	Weight (%)
1	C4:0 (Butyric)	4
2	C6:0 (Caproic)	4
3	C8:0 (Caprylic)	4
4	C10:0 (Capric)	4
5	C11:0 (Undecanoic)	2
6	C12:0 (Lauric)	4
7	C13:0 (Tridecanoic)	2
8	C14:0 (Myristic)	4
9	C14:1 (Myristoleic)	2
10	C15:0 (Pentadecanoic)	2
11	C15:1 (cis-10-Pentadecenoic)	2
12	C16:0 (Palmitic)	6
13	C16:1 (Palmitoleic)	2
14	C17:0 (Heptadecanoic)	2
15	C17:1 (cis-10-Heptadecenoic)	2
16	C18:0 (Stearic)	4
17	C18:1n9c (Oleic)	4
18	C18:1n9t (Elaidic)	2
19	C18:2n6c (Linoleic)	2
20	C18:2n6t (Linolelaidic)	2
21	C18:3n6 (γ-Linolenic)	2
22	C18:3n3 (α-Linolenic)	2
23	C20:0 (Arachidic)	4
24	C20:1n9 (cis-11-Eicosenoic)	2
25	C20:2 (cis-11,14-Eicosadienoic)	2
26	C20:3n6 (cis-8,11,14-Eicosatrienoic)	2
27	C20:3n3 (cis-11,14,17-Eicosatrienoic)	2
28	C20:4n6 (Arachidonic)	2
29	C20:5n3 (cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic)	2
30	C21:0 (Henicosanoic)	2
31	C22:0 (Behenic)	4
32	C22:1n9 (Erucic)	2
33	C22:2 (cis-13,16-Docosadienoic)	2
34	C22:6n3 (cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic)	2
35	C23:0 (Tricosanoic)	2
36	C24:0 (Lignoceric)	4
37	C24:1n9 (Nervonic)	2

O detector utilizado para a análise de ácidos gordos é de ionização por chama, (FID *flame ionization detector*), onde o eluato é dirigido para uma chama de ar/hidrogénio, produzindo iões e electrões e a detecção envolve a monitorização da corrente produzida ³⁶.

O eluato primeiro é misturado com o combustível de hidrogénio e depois com o oxidante. A mistura continua a percorrer a cabeça do injector onde existe uma tensão de polarização positiva. Esta tendência positiva ajuda a repelir os iões de carbono reduzidos criados pela chama em direção às placas de colector, conectadas a um amperímetro muito sensível, que detecta os iões e alimenta esse sinal para um amplificador, integrador e sistema de exibição ³⁵.

1.4. Validação de Métodos Analíticos

A validação é a confirmação através de provas objectivas de que os requisitos para um uso específico são cumpridos, definição ISO 8402:1994. Pode ser aplicada a amostras, metodologias e dados, sendo muitas vezes executada pelo analista ³⁶.

Os termos de validação e garantia de qualidade são amplamente utilizados e relacionados, sendo que a validação de um método prende-se com o estudo do objectivo analítico deste, formando assim o primeiro nível de garantia de qualidade de um laboratório (Figura 18). A garantia de qualidade analítica é o conjunto de medidas a que um laboratório se deve comprometer para garantir que possa sempre obter dados de alta qualidade. Além do uso de validação e métodos padronizados, procedimentos controlo de qualidade interna (IQC do inglês *Internal Quality Control*), o uso de materiais de referência, gráficos de controlo, testes de competência e acreditação ISO / IEC 17025 são pressupostos do controlo de qualidade ³⁷.

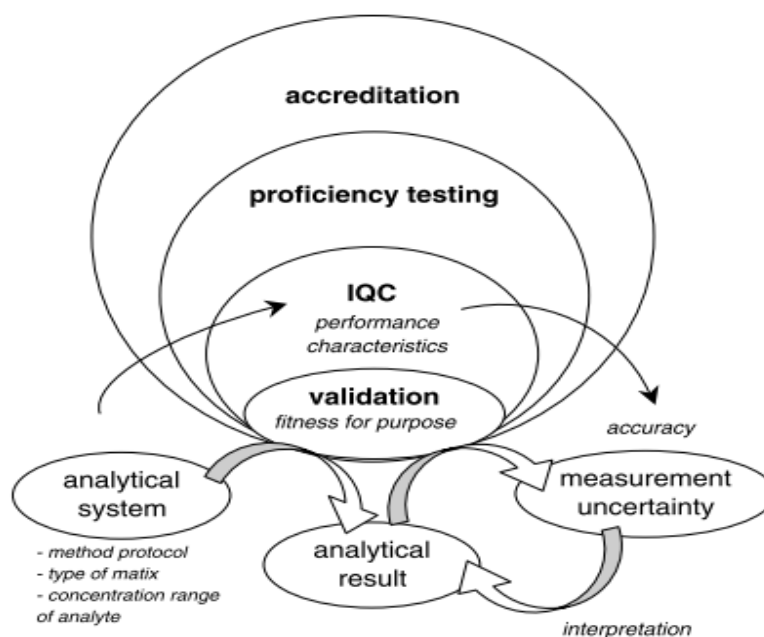


Figura 18 - Pressupostos de controlo de qualidade.

Segundo a Directiva 96/23/CE relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados, é necessário asseverar a qualidade e a comparabilidade dos resultados analíticos originados por laboratórios aprovados para o controlo oficial. Para o efeito, devem usar-se sistemas de garantia da qualidade e, especificamente, aplicar métodos validados em conformidade com procedimentos e critérios de desempenho comuns e garantir a rastreabilidade relativamente a normas comuns ou acordadas em comum. A Directiva 93/99/CE relativa a medidas adicionais respeitantes ao controlo oficial dos géneros alimentícios, e a Decisão 98/179/CE exigem que os

laboratórios oficiais de controlo sejam acreditados em conformidade com a norma ISO 17025 desde Janeiro de 2002. Nos termos da Decisão 98/179/CE, os laboratórios autorizados terão de participar num programa externo internacionalmente reconhecido de avaliação e acreditação do controlo de qualidade. Além disso, os laboratórios autorizados devem provar a sua competência participando regularmente e com êxito em programas de comprovação de capacidade reconhecidos ou organizados pelos laboratórios de referência nacionais ou comunitários ³⁸.

Os organismos de acreditação que reconheçam a competência de laboratórios de ensaio e calibração deverão recorrer à norma NP ISO/IEC 17025 como base para a acreditação, que especifica os requisitos para uma boa gestão e de competência técnica para o tipo de ensaios e/ou calibrações realizados pelo laboratório ³⁹.

A validação de um método pode incluir o estudo de parâmetros por avaliação directa e/ou indirecta. A avaliação directa é efectuada por comparação dos resultados obtidos com métodos normalizados, padrões ou materiais de referência certificados, recorrendo a comparações interlaboratoriais e tem como principal objectivo conhecer a exactidão do método de ensaio. A avaliação indirecta envolve estudos de representatividade do método, dos fundamentos teóricos, de interferências e fontes de erro, optimização das condições de operação e dos parâmetros característicos deste ⁴⁰.

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumular erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. É, então, fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objectivos, para demonstrarem, através da validação, que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida. Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros ^{41 42}:

1. Gama de trabalho/Linearidade;
2. Limiares analíticos (Detecção e Quantificação);
3. Sensibilidade;
4. Precisão;
5. Exactidão.

O procedimento de validação inicia-se com a definição da aplicação e objectivo do método e segue genericamente os passos da Figura 19 ⁴².

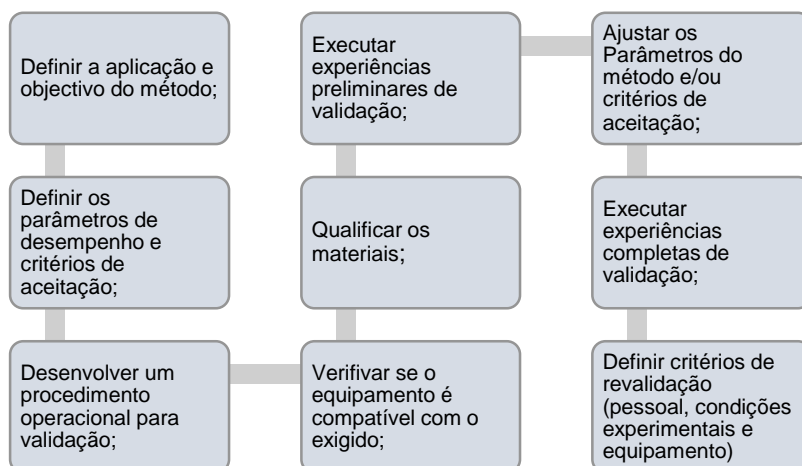


Figura 19 - Procedimento geral de validação.

1. Gama de Trabalho/Linearidade

O princípio da quantificação de um analito tem por base relacionar a resposta de um sistema de medida relativamente a uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida através da preparação de uma série de soluções padrão e respectiva curva de calibração. Uma curva de calibração deve basear-se num número mínimo de três pontos experimentais e um branco que enquadrem o intervalo de concentração da maior parte das amostras ensaiadas. A partir desta avalia-se a Gama de Trabalho e Linearidade do método ^{41,43}.

2. Limiares Analíticos

▪ Limite de Detecção (L.D.)

Teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Corresponde à menor quantidade de substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada numa amostra. Uma leitura inferior ao limite de detecção não significa a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar que, com uma certa probabilidade, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor. Pode ser obtido de uma forma geral e em termos quantitativos, pela Equação 1. Se a lei de probabilidade de X_0 é suficientemente conhecida e partindo do princípio que é gausseana (distribuição normal de erros) então toma-se o valor de 3,3 para um nível de confiança de cerca de 99,7% ⁴¹.

$$L.D. = X_0 + 3,3 \cdot \sigma_0 \quad (1)$$

X_0 – Média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho;

σ_0 – Desvio padrão associado a X_0 ;

- Limite de Quantificação (L.Q.)

Entende-se pela menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito com uma determinada exactidão e precisão ⁴¹.

$$L.Q. = X_0 + 10 \cdot \sigma_0 \quad (2)$$

3. Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito e pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido ΔL e a variação da concentração ΔC correspondente aquele acréscimo ⁴¹.

$$Sensibilidade = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (3)$$

4. Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Existem duas medidas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. A precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial surge como uma situação intermédia e situa-se entre estas duas medidas de precisão ⁴¹.

- Reprodutibilidade

A reprodutibilidade indica a precisão de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição como laboratório, operadores, épocas e/ou equipamentos ⁴¹.

- Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efectuado em condições idênticas, aludindo a ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como mesmo laboratório, analista, equipamento e reagentes.

A estimativa da variação do método, que permite o cálculo do desvio padrão da repetibilidade, pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de séries nas condições escolhidas. A variância associada à repetibilidade de um método em validação exprime-se por ⁴¹:

$$S_r^2 = \sum \frac{(xi - \bar{x})^2}{(n - 1)} \quad (4)$$

S_r^2 – Variância da repetibilidade associada aos resultados obtidos pelo laboratório;

xi – Valor obtido;

\bar{x} – Média dos resultados obtidos para cada matriz;

n – Número de amostras.

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com um nível de confiança específico, neste caso de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio nessas condições. Caso essa diferença seja superior ao limite de repetibilidade, deve ser efectuada uma análise crítica e repetição do ensaio ⁴¹.

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_r \quad (5)$$

r – Valor do limite de repetibilidade;

t – Valor da função t-Student com um nível de confiança seleccionado e número de graus de liberdade apropriado (neste caso foi utilizado para ∞ graus de liberdade, correspondendo a 1,96).

S_r – Desvio-padrão da repetibilidade.

Calcula-se, assim, o limite de repetibilidade relativo através da seguinte equação:

$$r_{rel} = \frac{r}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

r_{rel} – Valor do limite de repetibilidade relativo;

r – Valor do limite de repetibilidade;

\bar{x} – Média dos resultados obtidos para cada matriz.

▪ Precisão Intermédia

A precisão intermédia é avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições a variar, tais como analistas, equipamentos, épocas.

Para determinar a precisão intermédia de um determinado método, efectua-se algumas medições em replicado nas condições pré-definidas de repetibilidade. O desvio-padrão da precisão intermédia é calculado segundo a Equação 7 ⁴¹.

$$Si = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{j=1}^n (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (7)$$

Si – Desvio-padrão da precisão intermédia;

n – Número de amostras;

y_{j1} – Primeiro resultado obtido para uma amostra j ;

y_{j2} – Segundo resultado obtido para uma amostra j .

O valor do limite de precisão intermédia é calculado através da Equação 8,

$$PI = t \times \sqrt{2} \times \frac{Sr}{\bar{x}} \times 100 \quad (8)$$

PI – Valor do limite de precisão intermédia;

t – Valor da função t-Student para o nível de confiança selecionado e o número de graus de liberdade apropriado. Neste caso foi utilizado para ∞ graus de liberdade (1,96);

Si – Desvio-padrão da precisão intermédia (Equação 7);

Sr – Média dos resultados obtidos para cada matriz.

A recomendação ISO, com o intuito de averiguar a possível existência de outliers, efectua-se através do Teste de Grubbs calculando-se o valor G_{exp} :

$$G_{exp} = \frac{|x_{suspeito} - \bar{x}|}{s} \quad (9)$$

$x_{suspeito}$ – Valor mais afastado do valor médio;

\bar{x} – Valor médio;

s – Desvio-padrão.

O valor G_{exp} é comparado com o Valor Crítico a 1% (ANEXO A, Tabela A.1), e caso G_{exp} seja inferior ao valor crítico a 1%, $x_{suspeito}$ tem-se como aceitável.

Já para a avaliação de possíveis variâncias aberrantes aplica-se geralmente o Teste de Cochran (Equação 10) que compara a maior variância obtida nos ensaios com

a soma de todas as variâncias, tendo em consideração o valor C obtido e valores críticos tabelados (ANEXO A, Tabela A.2) ^{44 41}.

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum s_i^2} \quad (10)$$

s_{max}^2 – Maior variância obtida nos ensaios;

$\sum s_i^2$ – Soma das variâncias.

5. Exactidão

Considerando que um dos objectivos do sistema de gestão é garantir e controlar a qualidade dos resultados do dia-a-dia, é necessário avaliar periodicamente a exactidão (veracidade e a precisão) dos resultados, recorrendo ao controlo de qualidade externo e interno. A incerteza tem por vezes sido confundida com o erro de um resultado, o que não é correcto, pois a incerteza exprime a possibilidade de erro do resultado, enquanto que o erro é a medida da exactidão do resultado ⁴³.

A exactidão é designada pela concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, refere-se à combinação da veracidade (através da avaliação de erros sistemáticos) com a precisão (avaliação de erros aleatórios) ⁴⁵.

As acções de controlo de qualidade englobam geralmente:

- O uso de Materiais de Referência Certificados (MRC), ou padrões equivalentes;
- A participação em Ensaio de Comparação Interlaboratoriais (ECI) apropriados, nomeadamente de aptidão.

É frequente a realização de Ensaio de Comparação Interlaboratoriais (ECI's), que estimam o desempenho dos laboratórios através da avaliação de parâmetros como exactidão e precisão de resultados. Os laboratórios devem cumprir as com a participação em ensaios de aptidão e outros exercícios de comparação interlaboratorial definidos no documento DRC005 – Procedimento para Acreditação de Laboratórios, IPAC 2012 ^{43 45}.

Os MRC estabelecem a rastreabilidade das medições químicas e permitem controlar a exactidão do ensaio, sendo controlados segundo a ISO 13528 relativa a métodos estatísticos a usar em ensaios de aptidão por comparação interlaboratorial, demonstrando assim a sua estabilidade durante os testes. Assim, desde que disponíveis, devem ser usados quer durante a fase inicial de validação ou

implementação dos métodos, quer depois na sua utilização quotidiana. Para a realização de ECI's o Grupo Mérieux utiliza MRC por entidades certificadas como a Bipea ou Fapas, e, para a análise de desempenho considera-se a escala de Z-scores, onde se pretende que o valor de Z (factor de desempenho) seja inferior a 2 ⁴³:

$$Z = \frac{X_{lab} - X_v}{s} \quad (11)$$

X_{lab} – Valor obtido pelo Laboratório;

X_v – Valor aceite como verdadeiro (MRC);

s – Desvio-padrão do MRC.

O Grupo Mérieux possui internamente Procedimentos de Controlo da Qualidade (PCQ's) onde estão discriminadas metodologias e ferramentas utilizadas, nomeadamente a realização de duplicados em 10% das amostras analisadas, registado obrigatoriamente num impresso específico. O valor máximo aceite para a diferença entre duplicados é descrito pelo limite de repetibilidade estudado para cada análise.

Utilizam-se Materiais de Referência Internos (MRI) tais como Amostras de Controlo Diário (*Daily Process Control Sample* - DPCS) com cartas de controlo contruídas tendo em conta pelo menos vinte pontos obtidos por ensaios previamente realizados com os limites superior e inferior admissíveis.

2. Material e Métodos

2.1. Enquadramento no Procedimento

Inicialmente pesa-se a quantidade de amostra necessária para que não exceda 200 mg de matéria gorda (Tabela 8). Para minimizar a degradação oxidativa dos ácidos gordos durante a análise adiciona-se uma espátula rasa de pirogalol (1,2,3-benzenotriol).

A extração da matéria gorda ocorre envolve uma hidrólise ácida para a maioria dos alimentos (ácido clorídrico 25%), básica para o leite (amoníaco 25%) e a combinação de hidrólise ácida e básica no caso dos queijos, iogurtes e alimentação infantil à base de leite. Como padrão interno é adicionado tritridecanoato de glicerilo (C13) uma vez que em CG a maior forma de se obter uma boa precisão é através da utilização de padrões internos para que as incertezas introduzidas pela injeção da amostra na coluna sejam desta forma minimizadas.

Posteriormente, a matéria gorda é extraída com éter dietílico e éter de petróleo e metilada com trifluoreto de boro em metanol. A mistura é injectada no sistema cromatográfico e os ésteres metílicos dos ácidos gordos são detectados por GC-FID. A sua identificação é possível com a ajuda de uma mistura padrão (C37) que dá indicação da ordem de eluição dos ácidos gordos presentes. Os resultados expressam-se de acordo com o produto alimentar em g/100 g.

Tabela 8 – Quantidade de amostra a pesar de acordo com a matéria gorda desta.

Teor de matéria gorda da amostra (%)	Massa (g)
0 – 3	5 – 6
3 – 10	1 – 2
10 – 20	0,7 – 1
20 – 40	0,4 – 0,6
>40	0,2 – 0,3

2.2. Aparelhos e utensílios

- Balança analítica, capaz de pesar com a aproximação de 0,1 mg (Sartorius BP 221 S – Max: 220 g);
- Cromatógrafo Gasoso equipado com detector FID (Hewlett Packard Plus +, hp 6890 Series);
- Coluna Capilar: Supelco Supleco 2560 (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm);
- Banho termostaticado com agitação (Julabo SW 22);
- Evaporador com corrente de azoto (Thermofisher);
- Evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-210, banho: Bunchi Heating Bath B-490);
- Vórtex (Velp Scientifica);
- Frascos de pirex (shots) de 100 mL com rolha;
- Tubos de vidro de 20 mL com rolha;
- Balões de fundo plano de 100 mL esmerilados;
- Pipetas Pasteur de vidro;
- Pipetas automáticas de 1, 5 e 10 mL;
- Pipetas de duplo traço de 1 e 2 mL;
- Pipetas Eppendorf Multipette Plus;
- Vials para GC de 2 mL;
- Provetas.

2.3. Reagentes

- Ácido clorídrico a 35 - 37%, VWR;
- Pirogalol 98%, Sigma-Aldrich;
- Etanol a 96%, VWR;
- Éter dietílico 99,8%, Honeywell;
- Éter de petróleo VWR;
- Amoníaco a 25%, VWR;
- Sulfato de sódio anidro;
- Clorofórmio 99,2 %, VWR;
- Tolueno 99,8%, Carlo Erba;
- Metanol 100%, VWR;
- n-Hexano 98%, VWR;
- Trifluoreto de boro, 14% em metanol, Sigma-Aldrich;

- Mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos - Sigma-Aldrich: Supelco C37 FAME Mix (47885);
- Tritridecanoato de glicerilo 99% (triglicerídeo C13:0) (Sigma T3882).

Todos os reagentes utilizados são de qualidade analítica e a água é desionizada.

2.4. Hidrólise

2.4.1. Tratamento de alimentos em geral

Na balança analítica pesar para um frasco de pirex de 100 mL a amostra de acordo com a Tabela 8 e registar a massa. Adicionar 100 mg de pirogallol à amostra.

Na hotte medir 2 mL de água desionizada e 10 mL de ácido clorídrico a 25% com ajuda de uma pipeta graduada. Medir 2 mL de solução de padrão interno (6 g/L) com pipeta de vidro de duplo traço. Tapar e agitar a mistura em vórtex até à dispersão total da matriz.

Colocar a amostra num banho com agitação automática durante 1 hora a 75°C.

2.4.2. Tratamento do Leite

Na balança analítica pesar, para um frasco de pirex de 100 mL 3,0 - 3,5 g de leite líquido ou 0,5 a 0,6 g no caso de leite em pó. Registar a massa. Adicionar 100 mg de pirogallol. Na hotte medir 4 mL de água desionizada e 2 mL de amoníaco a 25% com pipeta de vidro. Medir 2 mL de solução de padrão interno (C13) com pipeta de vidro de duplo traço. Tapar e agitar a mistura em vórtex até à dispersão total da matriz.

Introduzir a amostra num banho com agitação automática durante 1 hora a 75°C.

2.4.3. Tratamento de queijos, iogurtes e de alimentos infantis à base de leite

Na balança analítica pesar, para um frasco de pirex de 100 mL 0,5 a 0,6 g de queijo e alimentos infantis à base de leite ou 4,0 a 5,0 g no caso de iogurtes. Registar a massa m. Adicionar 100 mg de pirogallol. Na hotte medir 4 mL de água desionizada; 2 mL de amoníaco a 25% com pipeta de vidro e 2 mL de etanol a 96%. Medir 2 mL de

solução de padrão interno (C13) com pipeta de vidro de duplo traço. Tapar e agitar a mistura em vórtex até à dispersão total da matriz.

Introduzir a amostra num banho com agitação automática durante 30 minutos a 75°C. Deixar a mistura arrefecer à temperatura ambiente e, na hotte, juntar 10 mL de ácido clorídrico a 35%, com ajuda de um dispensador. Voltar a colocar a amostra num banho com agitação automática durante 30 minutos a 75°C.

2.5. Extração e Metilação

Após banho de hidrólise, deixar arrefecer a amostra à temperatura ambiente e adicionar 10 mL de etanol a 96% com um dispensador. Medir 25 mL de éter dietílico para o shott de 100 mL que contém a amostra após a hidrólise. Agitar em vórtex durante 1 minuto, medir 25 mL de éter de petróleo, com dispensador. Agitar em vórtex durante 1 minuto. Deixar repousar durante uma hora. A fase superior deve ser clara e límpida de modo a que as duas fases possam ser separadas. Lavar o sistema de extração de vidro aspirando 50 mL de etanol, 50 mL de éter dietílico e 50 mL de éter de petróleo. Estes devem ser rejeitados no final da lavagem. Depois do sistema de extração estar limpo, introduzir a pipeta do sistema de aspiração no shott de 100 mL alcançando uma interface de 4 mm. Aspirar a fase superior e depositar num balão redondo de fundo plano de 100 mL (ter o cuidado para não aspirar a fase aquosa). Lavar a pipeta aspirando uma pequena quantidade de éter dietílico que se deposita no balão de fundo plano. Lavar o exterior da pipeta com uma pequena quantidade de éter dietílico. Aspirar o solvente utilizado e recolhê-lo no balão redondo de fundo plano. Repetir a extração com 15 mL de éter dietílico e 15 mL de éter de petróleo e reunir a fase etérea no mesmo balão redondo de fundo plano de 100 mL. Evaporar o solvente a 45°C no evaporador rotativo. Dissolver a gordura com 2 mL de clorofórmio e 1 mL de éter dietílico. Pipetar 2 mL da solução obtida e, para um tubo de vidro de 20 mL, colocar o tubo a 45°C em corrente de azoto.

Ao tubo de vidro de 20 mL com a gordura extraída adicionar, com uma pipeta de vidro, 2 mL de solução de trifluoreto de boro a 7% e 1 mL de tolueno. Colocar o tubo num banho com agitação durante 1 hora a 100°C para que ocorra a metilação a quente. Após este arrefecer até à temperatura ambiente, adicionar 5 mL de água desionizada, 1 mL de n-hexano com pipeta graduada e 1 g de sulfato de sódio anidro. Agitar em vórtex, deixar repousar a solução até que sejam visíveis duas fases e transferir a fase superior para um vial.

2.6. Condições Cromatográficas

Coluna: SUPELCO SP-2560 (100 m x 0,25 mm ID, 0,2 µm); Detector FID a 285°C; Injector: split 90:1 a 225°C; Forno: 100°C (0 min); rampa 5,34°C/min até 204°C (5,6 min); 8°C/min até 214°C (3,75 min); 8°C min até 240°C (6 min); Fluxo constante (2,5 mL/ min). Velocidade Linear: 43/s cm. Gás de transporte: Hidrogénio; Volume de injeção: 1 µL; Tempo de análise: 39,33 minutos.

2.7. Cálculos

2.7.1. Cálculos aplicados à mistura de padrões C37

Obtido o cromatograma da mistura de padrões C37, com a área de cada éster metílico de ácido gordo (FAME) identificado, calcula-se a percentagem relativa da área de cada FAME através da seguinte fórmula:

Percentagem relativa da Área de cada Éster Metílico de Ácido Gordo (FAME)

$$\% \text{ Relativa da Área de cada FAME} = \frac{\text{Área Individual FAME}}{\text{Somatório das Áreas}} \times 100$$

Os factores de resposta são determinados pela análise da mistura de padrões C37. A resposta de cada FAME é calculada por comparação com o padrão interno C13. Ao dividir a percentagem relativa da área de cada componente da mistura C37 pela sua percentagem em massa obtém-se a área normalizada em relação à massa para cada FAME (Ki).

Área normalizada em relação à massa para cada FAME (Ki)

$$K_i = \frac{\% \text{ Relativa da Área cada FAME}}{\text{Massa do Ácido Gordo existente no padrão C37 em \%}}$$

Ao dividir o factor Ki de cada um dos padrões FAME pelo Ki do C13, dado que este está presente na mistura C37, os resultados obtidos correspondem aos factores de resposta Ri de cada padrão FAME em relação ao padrão interno C13.

Factor de resposta de cada padrão FAME em relação ao padrão interno C13:0 (Ri)

$$R_i = \frac{K_i}{K_{i(C13)}}$$

2.7.2. Cálculos aplicados às amostras

A concentração do padrão interno é dada pela seguinte fórmula:

Concentração de Triglicérideo C13 em mg/mL (C_{C13})

$$C_{C13} = \frac{m \text{ pesada C13}}{\text{Volume C13}} \times \text{Pureza}$$

A massa de C13 presente na amostra, em mg, considerando 2 mL o volume de C13 adicionado, é calculada da seguinte forma:

Massa de C13 na amostra em mg (m_{C13})

$$m_{C13} = C_{C13} \times \text{Volume C13 adicionado a cada amostra (mL)} \times \frac{Mr_{C13} \text{ (TRITRIDECANOATO DE METILO)}}{Mr \text{ do Triglicerídeo C13}}$$

$$m_{C13} = C_{C13} \times 2 \times \frac{3 \times 228,37}{681,08} = C_{C13} \times 2,0118$$

A quantidade de cada FAME presente na amostra, em mg, é calculada pela seguinte fórmula:

Massa de cada FAME na amostra em mg (m_{FAME})

$$m_{FAME} = \frac{\text{Área de cada FAME (\%)} \times \text{Massa C13 na amostra (em mg)}}{\text{Área do pico de C13 na amostra (\%)} \times R_i}$$

A conversão de FAME para triglicerídeos tem em consideração o factor fTG_i, sendo a massa de triglicerídeo presente na amostra o produto de m_{FAME} por fTG_i.

Massa de Triglicerídeos presentes na amostra em mg (m_{TG})

$$m_{TG} = m_{FAME} \times \text{Factor de conversão do padrão FAME para o Triglicerídeo correspondente (fTG}_i)$$

Quantidade de Gordura Total na amostra (%) em g/100g (GT)

$$GT = \frac{\sum m_{TG}}{\text{Massa da amostra pesada (em mg)}} \times 100$$

A conversão de FAME para ácidos gordos tem em consideração o factor fAG_i, assim:

Quantidade de cada Ácido Gordo presente na amostra em mg (m_{AG})

$$m_{AG} = m_{FAME} \times \text{Factor de conversão do padrão FAME para o Ácido Gordo correspondente (fAG}_i)$$

Os valores de fTG_i e fAG_i encontram-se representados em ANEXO B, Tabela B.1.

A quantidade de ácidos gordos saturados na amostra em g/100 g é obtida da seguinte forma:

Ácidos gordos saturados na amostra (%) em g/100g (AG_{Sat})

$$AG_{Sat} = \frac{\sum \text{Quantidade de cada ácido gordo saturado na amostra em mg}}{\text{massa da amostra pesada (em mg)}} \times 100$$

A quantidade de ácidos gordos monoinsaturados na amostra em g/100 g:

Ácidos gordos monoinsaturados na amostra (%) em g/100g (AG_{Mon})

$$AG_{Mon} = \frac{\sum \text{Quantidade de cada ácido gordo monoinsaturado na amostra em mg}}{\text{massa da amostra pesada (em mg)}} \times 100$$

A quantidade de ácidos gordos polinsaturados na amostra em g/100 g:

$$\text{Ácidos gordos polinsaturados na amostra (\% em g/100g)} (AG_{\text{Poli}})$$
$$AG_{\text{Poli}} = \frac{\Sigma \text{Quantidade de cada ácido gordo polinsaturado na amostra em mg}}{\text{massa da amostra pesada (em mg)}} \times 100$$

3. Resultados e discussão

3.1. Matrizes analisadas

No contexto da validação do método, os parâmetros de repetibilidade foram avaliados para seis matrizes, sendo três destas Materiais de Referência Certificados (MRC) que permitem avaliar a aptidão do método. Os critérios de precisão intermédia foram executados exclusivamente através dos MRC's.

1. Preparado de Carne (PC) – BIPEA Ready-made dish with meat 07-3320 - 03-5320;
2. Sopa – Soup 04-5520 - 04-5620;
3. Frutos Secos (FS) – Dried Fruits 03-6120 - 03-6120;
4. Leite;
5. Pão;
6. Farinha.

Cada matriz pertence a um grupo específico, Tabela 9, sendo que a título de validação, seja recomendado pelo menos três matrizes estudadas por grupo.

Tabela 9 – Matrizes estudadas e respectivo grupo.

Grupo	Matriz
Alimentos Confeccionados e Pré-Confeccionados	Preparado de Carne
	Sopa
Frutos, Algas, Produtos Hortícolas e Derivados	Frutos Secos
Leite, Produtos Lácteos e Derivados	Leite
Cereais, Leguminosas Pseudo-Cereais e Derivados	Pão
	Farinha

As matrizes 1), 2) e 3) são MRC, tendo sido comparado o intervalo de referência assim como o valor alvo para cada resultado do perfil de ácidos gordos. Estas foram tratadas de acordo com o ponto 2) Material e Métodos. Em todas foi adicionado um padrão interno que permitiu quantificar os ácidos gordos totais (AGT), assim como os teores em ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, uma vez que a massa de padrão adicionada às amostras é conhecida.

A sequência da análise determinada foi a seguinte: branco do equipamento (n-hexano), mistura de padrão c37 e posteriormente injeção da amostra a estudar. o

branco do equipamento permite a limpeza da coluna de eventuais resíduos de ácidos gordos. A injeção da mistura de padrões permite a identificação dos tempos de retenção de cada ácido gordo, assim como o cálculo do factor de resposta correspondente através da quantidade indicada no certificado de lote e referente área após integração.

Na Tabela 10 encontram-se discriminados os valores da quantidade de cada ácido gordo em g/100 g para as 10 amostras analisadas em condições de repetibilidade. Estão também detalhados os valores de AGT, assim como a quantidade de saturados, mono e polinsaturados presentes na amostra, nas mesmas unidades. As últimas duas colunas referem-se aos valores critério do MRC. Verifica-se que todos os valores analisados estão dentro dos limites. Segundo o relatório do MRC a tolerância para a quantificação de ácidos gordos cujo valor alvo é 0 corresponde ao intervalo de 0 a 0,20 g/100 g.

Através da média dos 10 valores obtidos, calculou-se o Z-Score para os ácidos gordos totais e ácidos gordos saturados. Tendo em consideração a Equação 11 e que o valor do desvio padrão do teste de aptidão para AGT, é de 0,10 e o seu valor alvo 3,18

g/100 g, obteve-se um Z igual a 1,0 utilizando o valor médio obtido pelo laboratório indicado na Tabela 14.

Com um desvio padrão de 0,10 e valor alvo de saturados de 1,31 g/100g, o valor de Z foi igual a 1,2 utilizando o valor médio obtido pelo laboratório indicado na Tabela 19. Para Z-Scores inferiores a 2, a diferença entre o valor obtido pelo laboratório e o valor tido como convencionalmente correcto é inferior ao dobro do desvio padrão do MRC, sendo assim este valor aceite.

Tabela 10 – Valores de Repetibilidade e de referência obtidos (g/100 g) para cada ácido gordo, assim como de ácidos Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados (Sat), Monoinsaturados (Mon) e Polinsaturados (Poli) da matriz Preparado de Carne.

AG	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	AG	Intervalo	Valor Alvo
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C4:0		
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C6:0		
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C8:0		
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C10:0		
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C11:0		
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C12:0		
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C13:0		
C14:0	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	C14:0	0 - 0,25	0,05
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C14:1		
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C15:0		
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C15:1		
C16:0	0,73	0,75	0,78	0,73	0,77	0,75	0,76	0,77	0,72	0,73	C16:0	0,60 - 1	0,8
C16:1	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08	C16:1	0 - 0,29	0,09
C17:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	C17:0	0 - 0,21	0,01
C17:1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	C17:1	0 - 0,21	0,01
C18:0	0,36	0,37	0,38	0,35	0,39	0,38	0,38	0,39	0,36	0,36	C18:0	0 - 0,60	0,4
C18:1n9t	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	C18:1n9t		
C18:1n9c	1,30	1,28	1,36	1,29	1,38	1,34	1,36	1,37	1,29	1,28	C18:1n9c	1,11 - 1,65	1,38
C18:2n6t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C18:2n6t		
C18:2n6c	0,36	0,35	0,38	0,36	0,40	0,38	0,38	0,39	0,37	0,37	C18:2n6c	0,15 - 0,55	0,35
C20:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	C20:0	0 - 0,21	0,01
C18:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C18:3n6c		
C20:1n9c	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	C20:1n9c	0 - 0,23	0,03
C18:3n3c	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	C18:3n3c	0 - 0,24	0,04
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C21:0		
C20:2n6c	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	C20:2n6c	0 - 0,22	0,02
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:0		
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:3n6c		
C22:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:1n9c		
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:3n3c		
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C23:0		
C20:4n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:4n6c		
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:2n6c		
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:0		
C20:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:5n3c		
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:1n9c		
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:6n3c		
AGT	3,00	3,00	3,17	3,00	3,20	3,10	3,15	3,19	2,99	2,98		2,86 - 3,5	3,18
SAT	1,16	1,18	1,23	1,15	1,22	1,19	1,21	1,23	1,15	1,15		1,11 - 1,51	1,31
MON	1,42	1,41	1,50	1,43	1,52	1,47	1,49	1,51	1,42	1,40			
POLI	0,42	0,41	0,45	0,43	0,46	0,45	0,45	0,45	0,43	0,43			

3.1.2. Sopa – Soup 04-5520 - 04-5620

Na Figura seguinte encontra-se o cromatograma referente a um dos replicados analisados da matriz Sopa. Esta matriz apresenta ácidos gordos saturados de cadeia média e curta, reflectindo a presença de produtos lácteos no MRC. O C4:0 é eluído aproximadamente aos 5,30 minutos, sendo que os picos que estão próximos e não identificados são relativos aos solventes utilizados na extração.

Em geral a presença de saturados em percentagem incide no intervalo de 62,7 a 69,7 %, mono de 22,6 a 27,6 % e poli de 4,8 a 6,4 %.

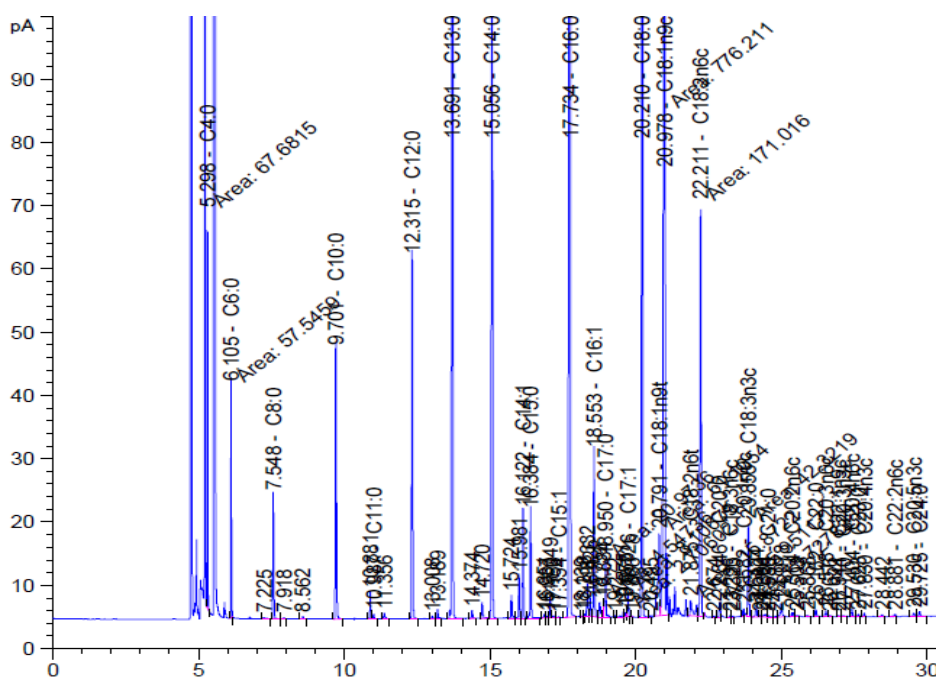


Figura 21 – Cromatograma relativo à matriz Sopa.

Dos replicados analisados na Tabela 11, é de salientar a ausência da amostra número nove, uma vez que na fase da metilação a quente, por defeito do tubo de metilação, o solvente evaporou no banho termostaticado a 100°C levando a resultados incoerentes.

Segundo o relatório do MRC a tolerância para a quantificação de ácidos gordos cujo valor alvo é 0 corresponde ao intervalo de 0 a 0,20 g/100 g. Os valores obtidos para cada ácido gordo estão dentro dos limites esperados.

O valor do desvio padrão do teste de aptidão para AGT é de 0,10, o seu valor alvo 1,65 g/100 g, assim Z é igual a 0,30 utilizando o valor médio obtido pelo laboratório indicado na Tabela 14. Com um desvio padrão de 0,10 e valor alvo de saturados de 1,09 g/100g, o valor de Z foi igual a 0,10, sendo assim este valor aceite.

Tabela 11 - Valores de Repetibilidade e de referência obtidos (g/100 g) para cada ácido gordo, assim como de Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados (Sat), Monoinsaturados (Mon) e Polinsaturados (Poli) da matriz Sopa.

AG	SOPA 1	SOPA 2	SOPA 3	SOPA 4	SOPA 5	SOPA 6	SOPA 7	SOPA 8	SOPA 10	AG	Intervalo	Valor Alvo
C4:0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	C4:0	0 - 0,25	0,05
C6:0	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	C6:0	0 - 0,23	0,03
C8:0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	C8:0	0 - 0,22	0,02
C10:0	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	C10:0	0 - 0,25	0,05
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C11:0		
C12:0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	C12:0	0 - 0,26	0,06
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C13:0		
C14:0	0,18	0,17	0,18	0,18	0,16	0,17	0,18	0,18	0,18	C14:0	0 - 0,25	0,05
C14:1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	C14:1	0 - 0,22	0,02
C15:0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	C15:0	0 - 0,22	0,02
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C15:1		
C16:0	0,50	0,50	0,51	0,50	0,47	0,50	0,51	0,52	0,50	C16:0	0,20 - 0,69	0,49
C16:1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	C16:1	0 - 0,23	0,03
C17:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	C17:0	0 - 0,21	0,01
C17:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	C17:1	0 - 0,20	0,01
C18:0	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17	C18:0	0 - 0,36	0,16
C18:1n9t	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	C18:1n9t		
C18:1n9c	0,35	0,34	0,35	0,34	0,40	0,35	0,35	0,35	0,34	C18:1n9c	0,17 - 0,57	0,37
C18:2n6t	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	C18:2n6t		
C18:2n6c	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	C18:2n6c	0 - 0,27	0,07
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:0	0 - 0,21	0,01
C18:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C18:3n6c		
C20:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:1n9c		
C18:3n3c	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	C18:3n3c	0 - 0,22	0,02
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C21:0		
C20:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:2n6c		
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:0		
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:3n6c		
C22:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:1n9c		
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:3n3c		
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C23:0		
C20:4n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:4n6c		
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:2n6c		
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:0		
C20:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:5n3c		
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:1n9c		
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:6n3c		
AGT	1,61	1,59	1,65	1,60	1,58	1,59	1,65	1,66	1,61		1,45 - 1,85	1,65
SAT	1,08	1,07	1,11	1,07	1,00	1,05	1,11	1,12	1,08		0,89 - 1,29	1,09
MON	0,43	0,42	0,43	0,42	0,47	0,43	0,44	0,43	0,42			
POLI	0,10	0,10	0,11	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,10			

3.1.3. Frutos Secos – Dried Fruits 03-6120 - 03-6120;

O cromatograma obtido de um dos replicados da matriz Frutos Secos encontra-se na Figura 22. O teor em ácidos gordos saturados é referente sobretudo ao C16:0 e C18:0, monoinsaturados pela presença de C18:1n9c e polinsaturados C18:2n6. Em percentagem no perfil, os ácidos gordos saturados correspondem de 18,8 a 23 %, monoinsaturados 57,1 a 64,1 % e polinsaturados 16,6 a 20,2 %.

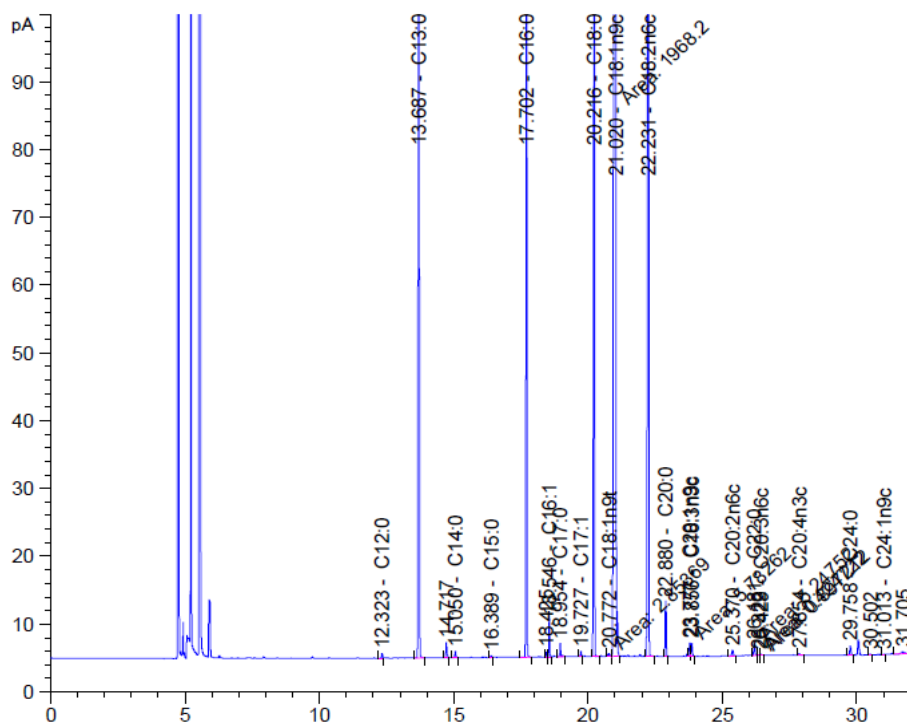


Figura 22 – Cromatograma relativo à matriz Frutos Secos.

Segundo o relatório do MRC a tolerância para a quantificação de ácidos gordos cujo valor alvo é 0 corresponde ao intervalo de 0 a 0,20 g/100 g. Os valores obtidos para cada ácido gordo estão dentro dos limites representados na Tabela 12.

O valor do desvio-padrão do teste de aptidão para AGT é de 1,75, o seu valor alvo 42,99 g/100 g, assim Z é igual a 1,56 utilizando o valor médio obtido pelo laboratório. Com um desvio padrão de 0,46 e valor alvo de saturados de 9,15 g/100g, o valor de Z foi igual a 1,45 sendo assim este valor aceite.

Tabela 12 - Valores de Repetibilidade e de referência obtidos (g/100 g) para cada ácido gordo, assim como de Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados (Sat), Monoinsaturados (Mon) e Polinsaturados (Poli) da matriz Frutos Secos.

AG	FS 1	FS 2	FS 3	FS 4	FS 5	FS 6	FS 7	FS 8	FS 9	FS 10	AG	Intervalo	Valor Alvo
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C4:0		
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C6:0		
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C8:0		
C10:0	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C10:0		
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C11:0		
C12:0	0,03	0,01	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	C12:0		
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C13:0		
C14:0	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	C14:0		
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	C14:1		
C15:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	C15:0		
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C15:1		
C16:0	5,00	4,93	5,00	4,96	4,99	5,01	4,98	4,98	5,01	4,98	C16:0	4,13 - 5,05	4,59
C16:1	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	C16:1	0 - 0,36	0,16
C17:0	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	C17:0	0 - 0,26	0,06
C17:1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	C17:1	0 - 0,22	0,02
C18:0	4,30	4,31	4,30	4,29	4,32	4,31	4,28	4,28	4,32	4,28	C18:0	3,66 - 4,48	4,07
C18:1n9t	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	C18:1n9t		
C18:1n9c	26,95	26,96	27,02	26,97	27,05	26,97	26,90	26,90	27,04	26,95	C18:1n9c	23,25 - 28,41	25,83
C18:2n6t	0,00	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	C18:2n6t		
C18:2n6c	8,50	8,50	8,53	8,53	8,51	8,51	8,50	8,50	8,54	8,50	C18:2n6c	7,15 - 8,75	7,95
C20:0	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	C20:0	0,09 - 0,49	0,29
C18:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C18:3n6c		
C20:1n9c	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	C20:1n9c	0 - 0,28	0,08
C18:3n3c	0,08	0,08	0,09	0,07	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	C18:3n3c	0 - 0,28	0,08
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	C21:0		
C20:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:2n6c		
C22:0	0,07	0,10	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	C22:0	0 - 0,26	0,06
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:3n6c		
C22:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:1n9c		
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:3n3c		
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C23:0		
C20:4n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:4n6c		
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:2n6c		
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:0		
C20:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C20:5n3c		
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C24:1n9c		
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	C22:6n3c		
AGT	45,70	45,66	45,84	45,66	45,83	45,75	45,62	45,62	45,87	45,66		39,49 - 46,49	42,99
SAT	9,85	9,79	9,86	9,76	9,84	9,84	9,78	9,78	9,87	9,79		8,23 - 10,07	9,15
MON	27,27	27,27	27,35	27,29	27,37	27,31	27,23	27,23	27,36	27,27			
POLI	8,58	8,60	8,63	8,62	8,62	8,60	8,61	8,61	8,64	8,60			

Os replicados obtidos para a quantidade de cada ácido gordo, assim como de AGT, saturados, monoinsaturados e polinsaturados das matrizes Leite, Pão e Farinha encontram-se nas tabelas em anexo (ANEXO C, Tabelas C.1; C.2 e C.3).

3.2. Ácidos Gordos Totais – Estudo da Repetibilidade

Para as seis matrizes estudadas em condições de repetibilidade calculou-se a média, variância (Equação 4), desvio-padrão, desvio padrão relativo, limite da repetibilidade (Equação 5) e limite da repetibilidade relativo (Equação 6) para a quantidade de AGT obtida pelo método.

O valor de AGT obtido para cada matriz encontra-se representado na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores de AGT obtidos em condições de Repetibilidade para cada matriz estudada.

REPETIBILIDADE										
Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
PC	3,00	3,00	3,17	3,00	3,20	3,10	3,15	3,19	2,99	2,98
FS	45,70	45,66	45,84	45,66	45,83	45,75	45,62	45,62	45,87	45,66
SOPA	1,61	1,59	1,65	1,60	1,58	1,59	1,65	1,66	X	1,61
LEITE	3,32	3,27	3,29	3,30	3,29	3,30	3,30	3,30	3,27	3,27
PÃO	3,18	3,20	3,15	3,19	3,17	3,20	3,14	3,06	3,12	3,20
FARINHA	3,17	3,23	3,31	3,32	3,22	3,30	3,21	3,13	3,19	3,24

Tendo em consideração os ensaios realizados, a Tabela 14 exprime os parâmetros analisados para o estudo da Repetibilidade do método.

Os Limites da Repetibilidade Relativos obtidos variam de 0,58 % a 8,37 %, assim a matriz Frutos Secos admite uma menor diferença absoluta entre dois resultados de ensaio nas mesmas condições e a matriz Preparado de Carne uma maior diferença, associada a um desvio-padrão relativo maior.

Tabela 14 – Parâmetros analisados para o estudo da Repetibilidade do método.

REPETIBILIDADE						
Matriz	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite da repetibilidade relativo
PC	3,08	0,009	0,092	2,990	0,258	8,37
FS	45,72	0,009	0,094	0,206	0,264	0,58
SOPA	1,62	0,001	0,030	1,852	0,084	5,19
LEITE	3,29	0,000	0,018	0,559	0,052	1,56
PÃO	3,16	0,002	0,046	1,462	0,130	4,09
FARINHA	3,23	0,004	0,064	1,978	0,179	5,54

Para avaliar a existência de possíveis outliers procedeu-se ao Teste de Grubbs (Equação 9), e, após calcular o Gp Valor mínimo e Gp Valor máximo, estes são comparados com os valores críticos tabelados para um nível de confiança a 99 % (ANEXO A, Tabela A.1). Como os valores G calculados são inferiores ao valor crítico a 1%, têm-se como aceitáveis.

Tabela 15 – Teste de Grubbs.

TESTE DE GRUBBS							
População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
10	2,482	2,9762	1,1160	Aceitável	3,2000	1,3150	Aceitável
10	2,482	45,6204	1,0739	Aceitável	45,8716	1,5873	Aceitável
9	2,387	1,5823	1,1322	Aceitável	1,6599	1,4602	Aceitável
10	2,482	3,2668	1,3489	Aceitável	3,3246	1,7921	Aceitável
10	2,482	3,0600	2,2088	Aceitável	3,2039	0,9034	Aceitável
10	2,482	3,1258	1,6769	Aceitável	3,3188	1,3413	Aceitável

O Teste C de Cochran (Equação 10) avalia a maior variância obtida nos ensaios, neste caso 0,009 relativa à matriz Frutos Secos, comparativamente ao Valor Crítico Tabelado com 95 % de confiança. Neste caso, este valor é aceite uma vez que $C_{Calc} < C_{Tab}$ (ANEXO A, Tabela A.2).

Tabela 16 – Teste C de Cochran.

Teste C de Cochran	Número de matrizes: 6	Maior variância: 0,009	Valor Crítico Tabelado - CC (5 %): 0,3682	Avaliação: $C_{Calc} < C_{Tab} 5\%$	Conclusão: Valor aceite
	Número de ensaios: 10	C de Cochran (calculado): 0,358			

Após a consideração e viabilização dos replicados obtidos, assim como os parâmetros associados, determinou-se o Valor do Limite da Repetibilidade para o método relacionado à quantificação de AGT. Logo, o Valor do Limite da Repetibilidade, calculado através da média dos Limites da Repetibilidade de cada matriz foi de 0,16 g/100 g, e o seu valor relativo 4,22 %. O Coeficiente de Variação Médio Relativo, numericamente igual ao desvio-padrão da repetibilidade a dividir pela média dos valores considerados foi igual a 1,51 %.

Tabela 17 – Valor do Limite da Repetibilidade, Valor do Limite da Repetibilidade Relativo e Coeficiente de Variação Médio Relativo para a quantificação de AGT.

Valor do Limite da Repetibilidade	0,16
Valor do Limite da Repetibilidade Relativo	4,22
Coeficiente de Variação Médio Relativo	1,51

3.3. Ácidos Gordos Saturados – Estudo da Repetibilidade

Para as seis matrizes estudadas em condições de repetibilidade calculou-se a média, variância (Equação 4), desvio-padrão, desvio padrão relativo, limite da repetibilidade (Equação 5) e limite da repetibilidade relativo (Equação 6) para a quantidades de Ácidos Gordos Saturados pelo método. Os valores de Ácidos Gordos Saturados obtidos para cada matriz encontra-se representado na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores de Ácidos Gordos Saturados obtidos em condições de Repetibilidade para cada matriz estudada.

REPETIBILIDADE										
Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
PC	1,16	1,18	1,23	1,15	1,22	1,19	1,21	1,23	1,15	1,15
FS	9,85	9,79	9,86	9,76	9,84	9,84	9,78	9,78	9,87	9,79
SOPA	1,08	1,07	1,11	1,07	1,00	1,05	1,11	1,12	X	1,08
LEITE	2,29	2,26	2,27	2,27	2,27	2,28	2,27	2,28	2,26	2,26
PÃO	0,61	0,64	0,59	0,62	0,60	0,65	0,62	0,59	0,59	0,63
FARINHA	0,85	0,88	0,91	0,91	0,87	0,89	0,88	0,83	0,86	0,88

Os parâmetros analisados para o estudo da Repetibilidade do método, entre os quais média obtida, desvio-padrão e Limite da Repetibilidade encontram-se representados na Tabela 19.

Os Limites da Repetibilidade Relativos obtidos variam de 1,18 % a 9,96 %, assim a matriz Frutos Secos admite uma menor diferença absoluta entre dois resultados de ensaio nas mesmas condições e a matriz Pão uma maior diferença, associada a um desvio-padrão relativo maior.

Tabela 19 — Parâmetros analisados para o estudo da Repetibilidade do método.

REPETIBILIDADE						
Matriz	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite da repetibilidade relativo
PC	1,19	0,001	0,035	2,942	0,098	8,24
FS	9,82	0,002	0,041	0,422	0,116	1,18
SOPA	1,08	0,001	0,037	3,472	0,105	9,72
LEITE	2,27	0,000	0,010	0,447	0,028	1,25
PÃO	0,61	0,001	0,022	3,556	0,061	9,96
FARINHA	0,88	0,001	0,025	2,790	0,069	7,81

Efectuou-se novamente o Teste de Grubbs (Equação 9), e, após calcular o Gp Valor mínimo e Gp Valor máximo, estes são comparados com os valores críticos tabelados para um nível de confiança a 99 % (ANEXO A, Tabela A.1). Como os valores G calculados são inferiores ao valor crítico a 1%, têm-se como aceitáveis.

Tabela 20 – Teste de Grubbs.

TESTE DE GRUBBS							
População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
10	2,482	1,15	1,118	Aceitável	1,23	1,248	Aceitável
10	2,482	9,76	1,419	Aceitável	9,87	1,435	Aceitável
9	2,387	1,00	2,140	Aceitável	1,12	1,167	Aceitável
10	2,482	2,26	1,411	Aceitável	2,29	2,094	Aceitável
10	2,482	0,59	1,285	Aceitável	0,65	1,646	Aceitável
10	2,482	0,83	1,864	Aceitável	0,91	1,354	Aceitável

O Teste C de Cochran (Equação 10) avalia a variância relativa à matriz Frutos Secos, comparativamente ao Valor Crítico Tabelado com 95 % de confiança (ANEXO A, Tabela A.2. Neste caso, este valor é aceite uma vez que C Calc < C Tab.

Tabela 21 – Teste de Cochran.

Teste C de Cochran	Número de matrizes: 6	Maior variância: 0,002	Valor crítico tabelado - CC (5 %): 0,3682	Avaliação: CCalc < Ctab 5 %	Conclusão: Valor aceite
	Número de ensaios: 10	C de Cochran (calculado): 0,312			

Determinou-se o Valor do Limite da Repetibilidade para o método quanto à quantificação de Ácidos Gordos Saturados. Logo, o Valor do Limite da Repetibilidade, calculado através da média dos Limites da Repetibilidade de cada matriz foi de 0,08 g/100 g, e o seu valor relativo 6,36 %. O Coeficiente de Variação Médio Relativo, numericamente igual ao desvio-padrão da repetibilidade a dividir pela média dos valores considerados foi igual a 2,27 %.

Tabela 22 - Valor do Limite da Repetibilidade, Valor do Limite da Repetibilidade Relativo e Coeficiente de Variação Médio Relativo para a quantificação de ácidos gordos saturados.

Valor do Limite da Repetibilidade	0,08
Valor do Limite da Repetibilidade Relativo	6,36 %
Coeficiente de Variação Médio Relativo	2,27 %

3.4. Ácidos Gordos Totais – Estudo da Precisão Intermédia

A precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões com o mesmo método, no mesmo laboratório mas variando a época, foi determinada pelo Limite da Precisão Intermédia. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. Recorrendo à Equação 7 e utilizando os valores da Tabela 23 relativo às medições em duplicado durante cinco dias diferentes, calculou-se a o desvio-padrão da Precisão Intermédia e consequentemente o seu limite. A análise efectuou-se para as matrizes: Preparado de Carne, Sopa e Frutos Secos.

Tabela 23 – Valores de AGT obtidos em duplicado e diferença absoluta entre estes (W_i).

Dia	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	W_i
1	PC	2,84	2,96	0,12
2	PC	2,97	2,82	0,15
3	PC	2,99	3,05	0,06
4	PC	2,89	3,00	0,11
5	PC	3,11	2,96	0,15
1	SOPA	1,65	1,65	0,00
2	SOPA	1,63	1,64	0,01
3	SOPA	1,63	1,66	0,03
4	SOPA	1,65	1,64	0,01
5	SOPA	1,65	1,61	0,04
1	FS	45,50	45,57	0,07
2	FS	45,50	45,39	0,11
3	FS	45,43	45,48	0,05
4	FS	45,66	45,48	0,18
5	FS	45,25	45,09	0,16

Respeitam-se as condições de repetibilidade na medida em que o Limite de Repetibilidade calculado é superior ao valor de W_i .

Tabela 24 – Desvio-padrão da precisão intermédia, coeficiente de variação médio e limite da precisão intermédia calculados.

População:	15
Desvio padrão da precisão intermédia:	0,07
Coeficiente de variação médio:	0,43%
Limite da precisão intermédia:	1,21%

3.5. Ácidos Gordos Saturados - Estudo da Precisão Intermédia

Na Tabela 25 encontram-se os valores de de ácidos gordos saturados obtidos em duplicado realizados em cinco dias diferentes e a diferença absoluta entre estes (W_i).

Tabela 25 - Valores de Ácidos Gordos Saturados obtidos em duplicado e diferença absoluta entre estes (W_i).

Dia	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	W_i
1	MEAT	1,09	1,13	0,04
2	MEAT	1,14	1,09	0,05
3	MEAT	1,16	1,18	0,02
4	MEAT	1,12	1,14	0,02
5	MEAT	1,21	1,14	0,07
1	SOPA	1,13	1,11	0,02
2	SOPA	1,12	1,11	0,01
3	SOPA	1,11	1,10	0,01
4	SOPA	1,11	1,11	0,00
5	SOPA	1,15	1,08	0,07
1	FS	9,77	9,84	0,07
2	FS	9,58	9,61	0,03
3	FS	9,59	9,63	0,04
4	FS	9,55	9,60	0,05
5	FS	9,71	9,65	0,06

Tabela 26 - Desvio-padrão da precisão intermédia, coeficiente de variação médio e limite da precisão intermédia calculados.

População:	15
Desvio padrão da precisão intermédia:	0,03
Coeficiente de variação médio:	0,78 %
Limite de precisão intermédia:	2,19 %

Consideram-se definidas as condições de repetibilidade uma vez que o Limite de Repetibilidade calculado é superior ao valor de W_i .

4. Considerações Finais e Conclusão

Um laboratório de investigação e prestação de serviços ao público tem características distintas de um laboratório de controlo da produção industrial. Normalmente o primeiro tem que analisar matrizes variadas e complexas. Para o efeito, devem-se usar sistemas de garantia da qualidade e, especificamente, aplicar métodos validados em conformidade com procedimentos e critérios de desempenho comuns.

De modo a iniciar a validação do método proposto, procedeu-se à avaliação dos parâmetros de repetibilidade e precisão intermédia para a quantidade de ácidos gordos totais e saturados.

Diferentes matrizes apresentam diferentes limites de repetibilidade relativos devido à natureza da amostra em estudo. Assim, por exemplo, a matriz Frutos Secos admite uma menor diferença absoluta entre dois resultados de ensaio nas mesmas condições e a matriz preparado de carne uma maior diferença, associada a um desvio-padrão relativo maior na análise dos ácidos gordos totais. O coeficiente de variação médio relativo, numericamente igual ao quociente do desvio-padrão da repetibilidade pela média dos valores considerados foi de 1,51 % para os ácidos gordos totais. O coeficiente de variação médio relativo calculado para as mesmas seis matrizes, indicativo da repetibilidade da análise de ácidos gordos saturados foi igual a 2,27 %.

Consideram-se definidas as condições de repetibilidade uma vez que o Limite de Repetibilidade calculado é superior ao valor da diferença absoluta de duplicados indicados no estudo de critérios de precisão intermédia. Esta última medida de precisão é considerada como a mais adequada para a análise da variabilidade dos resultados uma vez que tem como influencia o factor tempo. Como só se utilizaram os três MRC para o cálculo da precisão intermédia, só a variabilidade destes foi considerada – levando a menores coeficientes de variação para a precisão intermédia.

Relativamente aos testes de aptidão e avaliação de Z-Scores, os resultados obtidos foram inferiores a 2, indicando que a diferença entre o valor do laboratório e o valor tido como convencionalmente correcto é inferior ao dobro do desvio padrão do MRC.

Em cromatografia gasosa a robustez pode ser afectada por diferentes lotes, fabricantes da coluna, temperatura e velocidade do gás de arraste e a maior forma de se obter uma boa precisão é através da utilização de padrões internos para que as incertezas introduzidas pela injeção da amostra na coluna ou condicionantes de temperatura sejam desta forma minimizadas.

A optimização referente à aplicação do método comparativamente ao existente na empresa relaciona-se principalmente com o factor tempo, diminuindo o tempo de análise para o novo método devido à mudança da rampa de temperatura e gás de arraste utilizado, passando de hélio para hidrogénio. Com o hidrogénio o tempo de análise é menor comparativamente ao hélio, para além de ser uma opção mais económica. A velocidade máxima do gás é proporcional à difusividade. O hidrogénio tem uma maior difusividade do que o hélio, portanto, a sua velocidade linear é maior e pode ser usada sem afectar adversamente a eficiência ⁴⁶.

Com colunas de maior polaridade obtém-se boa resolução, especialmente de isómeros posicionais ou geométricos, sendo recomendadas para análises de ácidos gordos de rotina.

As perspectivas de trabalho futuro consideradas são o cálculo da gama de trabalho do método, validação de outras matrizes e cálculo da precisão intermédia, repetibilidade e incertezas aplicadas para cada ácido gordo presente nas matrizes.

5. Referências Bibliográficas

- I. Resumo Histórico da Silliker Portugal, disponível em:
www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal
Acedido a 2 Dezembro de 2017.
 - II. Mérieux Nutrisciences Corporate Brochure 2016, disponível em:
https://www.merieuxnutrisciences.com/corporate/sites/corporate/files/atoms/files/english_-_corporate_brochure.pdf
Acedido a 2 de Dezembro de 2017.
 - III. Mérieux Nutrisciences Qualidade e Segurança Alimentar, disponível em:
<https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar>
Acedido a 2 de Dezembro de 2017.
 - IV. Lipid Bank; disponível em:
<http://www.lipidbank.jp>
Acedido a 21 de Dezembro de 2017.
 - V. Chartbin Statistics Consumo Mundial de Gordura, disponível em:
<http://chartsbin.com/view/1156>
Acedido a 13 Janeiro de 2018
-
- (1) Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry*; John Wiley & Sons; United States, 2008.
 - (2) Cox, M. M.; Nelson, D. L. *Lehninger Principles of Biochemistry*; W.H.Freeman & Co; New York, 2008.
 - (3) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; Meer, G. Van; Vannieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A. *A comprehensive classification system for lipids*; 2005.
 - (4) Fahy, E.; Cotter, D.; Sud, M.; Subramaniam, S. *Lipid classification, structures and tools*; 2014.
 - (5) Adjepong, M.; Valentini, K.; Pickens, C. A.; Li, W. *Quantification of fatty acid and mineral levels of selected seeds, nuts, and oils in Ghana*; Elsevier Inc., 2017.
 - (6) Leray, C. *Lipids Nutrition and Health*; Group, T. & F.; Florida, 2015.
 - (7) Ran-ressler, R. R.; Khailova, L.; Arganbright, K. M.; Adkins-rieck, C. K.; Zeina, E. *Branched Chain Fatty Acids Reduce the Incidence of Necrotizing Enterocolitis and*

Alter Gastrointestinal Microbial Ecology in a Neonatal Rat Model; 2011.

- (8) Trumbo, P. R.; Vorosmarti, A.; Kimberly Stitzel; Holloway, C. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*; The National Academic Press: Washington, 2005.
- (9) Cruz, R.; Graça, P. *Trans fatty acids in the Portuguese food market*; 2016.
- (10) Torres, A. G.; Nunes, J. C. *Journal of Food Composition and Analysis Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products , and contribution to daily intake of CLA*; Elsevier Inc., 2010.
- (11) Comissão Europeia. In *Regulamento UE: 1169/2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios*; 2011.
- (12) Zock, L.; Martijn, B. *Hydrogenation alternatives : effects of trans fatty acids and stearic acid versus linoleic acid on serum lipids and lipoproteins in humans*; 1992.
- (13) Winiarska-mieczan, A.; Klebaniuk, R.; Kiczorowski, P.; Zasadna, Z.; Effects, C. *Comparative Effects of Organic , Traditional , and Intensive Production with Probiotics on the Fatty Acid Profile of Cow ' s Milk Running title : N utritional composition of organic and conventional milk Highlights .;* Elsevier Inc., 2017.
- (14) Chandan, R. C. *Role of Milk and Dairy Foods in Nutrition and Health*; 2016.
- (15) Markey, O.; Souroullas, K.; Fagan, C. C.; Kliem, K. E.; Vasilopoulou, D.; Jackson, K. G.; Humphries, D. J.; Grandison, A. S.; Givens, D. I.; Lovegrove, J. A.; Methven, L. *Consumer acceptance of dairy products with a saturated fatty acid – reduced , monounsaturated fatty acid – enriched content*; American Dairy Science Association, 2017.
- (16) Wood, J. D.; Enser, M.; Fisher, A. V; Nute, G. R.; Sheard, P. R.; Richardson, R. I.; Hughes, S. I.; Whittington, F. M. *Meat Fat deposition , fatty acid composition and meat quality: A review*; 2008.
- (17) Instituto Nacional de Estatística (INE). *Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016*.
- (18) Monguchi, T.; Hara, T.; Hasokawa, M. *Excessive intake of trans fatty acid accelerates atherosclerosis through promoting inflammation and oxidative stress in a mouse model of hyperlipidemia*; Japanese College of Cardiology, 2017.
- (19) Micha, R.; Mozaffarian, D. *Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke and diabetes*; Boston, 2010.

- (20) Ahmad, M. U. *Fatty Acids Chemistry, Synthesis and Applications*; Elsevier: United States, 2017.
- (21) Wang, T. Y.; Liu, M.; Portincasa, P.; Wang, D. *New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption*; 2014.
- (22) Guo, Q.; Ye, A.; Bellissimo, N.; Singh, H.; Rousseau, D. *Modulating fat digestion through food structure design*; Elsevier Ltd: Canada, 2017.
- (23) Maurício, S. A Produção de Biodiesel a partir de Óleos Alimentares Usados, Universidade de Aveiro, 2008.
- (24) Kezic, N.; Bolanc, V. *Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples*.
- (25) Pluta, A.; Stró, P. B.; Jacek, K.; Lis, K.; Sulikowska, B.; Manitius, J. *Beneficial Effects of 6-Month Supplementation with Omega-3 Acids on Selected Inflammatory Markers in Patients with Chronic Kidney Disease Stages 1 – 3*; Poland, 2017.
- (26) Christie, W.; Han, X. *Lipid Analysis: isolation, separation, identification and lipidomic analysis*; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2012.
- (27) Nielsen, S. S. *Food Analysis Laboratory Manual*; Springer International: USA, 2017.
- (28) Breil, C.; Vian, M. A.; Zemb, T.; Kunz, W.; Chemat, F. *“Bligh and Dyer” and Folch Methods for Solid – Liquid – Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms . Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents*; 2017.
- (29) Food and Agriculture Organization. In *Manuals of food quality control*; Rome, 1997.
- (30) Gökmen, V.; Ataç, B.; Barone, R.; Fogliano, V.; Kaplun, Z. *Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids*; 2011.
- (31) Carrapiso, A. I.; García, C. *Development in Lipid Analysis: Some New Extraction Techniques and in situ Transesterification*; 2000.
- (32) Salimon, J.; Omar, T. A.; Salih, N. *An accurate and reliable method for identification and quantification of fatty acids and trans fatty acids in food fats samples using gas chromatography*; King Saud University, 2017.

- (33) Zhang, H.; Wang, Z.; Liu, O. *Development and validation of a GC – FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids*; Xi'an Jiaotong University: Xangai, 2015.
- (34) Picó, Y. *Chemical analysis of food techniques and applications*; University of Valencia, Spain, 2012.
- (35) Harris, D. *Quantitative Chemical Analysis*; W. H. Freeman and Company, Ed.; Craig Bleyer: California, 2007.
- (36) Skoog, D.; Crouch, S.; Holler, J.; West, D. *Fundamentos de Química Analítica*, 8th ed.; Thomson Learning; 2006.
- (37) Taverniers, I.; Loose, M. De; Bockstaele, E. Van. *Trends in quality in the analytical laboratory, analytical method validation and quality assurance*; 2004.
- (38) Comissão Europeia. In *Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados*; 2002.
- (39) Comité Europeu de Normalização. In *NP EN ISO/IEC 17025:2005 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*; 2005.
- (40) Eurachem. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*; 2014.
- (41) Relacre. *Guia Relacre 13 Validação de métodos internos de ensaio em análise química*; 2000.
- (42) World Health Organization. *Supplementary guidelines on good manufacturing practices validation*; 2006.
- (43) Relacre. *Guia Relacre 3 Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*; 1996.
- (44) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*.
- (45) IPAC. *Guia para acreditação de laboratórios químicos OGC002*; 2011.
- (46) Adam, P. Hydrogen as an alternative to Helium for gas chromatography; Pullach, Germany **2012**.
- (47) Sigma-Aldrich Co. *Bulletin 907 Comparison of 37 Component FAME Standard on Four Capillary GC Columns*; USA.

6. ANEXOS

ANEXO A

Tabela A. 1 – Valores Críticos para o Teste de Grubs ($\alpha=0,05$)

<i>n</i>	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>G</i>	1.15	1.48	1.71	1.89	2.02	2.13	2.21	2.29	2.34
<i>n</i>	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>G</i>	2.41	2.46	2.51	2.55	2.54	2.62	2.65	2.68	2.71
<i>n</i>	21	22	23	24	25	30	35	40	50
<i>G</i>	2.73	2.76	2.78	2.80	2.82	2.91	2.98	3.04	3.13
<i>n</i>	60	70	80	90	100	110	120	130	140
<i>G</i>	3.20	3.26	3.31	3.35	3.38	3.42	3.44	3.47	3.49

Tabela A. 2 – Valores críticos para o Teste de Cochran referente à homogeneidade da variância ($\alpha=0,05$)

<i>m</i> = número de réplicas da estimativa de cada variância								
<i>n</i>	2	3	4	5	6	7	10	∞
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8010	0.5000
3	0.9969	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6167	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5017	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4214	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3682	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3259	0.1429
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2439	0.1000
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1357	0.0500
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.0958	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0745	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0520	0.0167

ANEXO B

Tabela B.1 - Factor de conversão do padrão FAME para o Triglicerídeo correspondente (fTG_i) e para o Ácido Gordo correspondente (fAG_i).

AG	fTG _i	fAG _i
C4:0	0,987	0,863
C6:0	0,990	0,892
C8:0	0,992	0,903
C10:0	0,993	0,911
C11:0	0,993	0,925
C12:0	0,994	0,930
C13:0		
C14:0	0,995	0,942
C14:1	0,994	0,942
C15:0	0,995	0,945
C15:1	0,995	0,945
C16:0	0,995	0,948
C16:1	0,995	0,948
C17:0	0,995	0,951
C17:1	0,995	0,950
C18:0	0,996	0,953
C18:1n9t	0,996	0,953
C18:1n9c	0,996	0,953
C18:2n6t	0,995	0,952
C18:2n6c	0,995	0,952
C20:0	0,996	0,957
C18:3n6c	0,995	0,952
C20:1n9c	0,996	0,957
C18:3n3c	0,995	0,952
C21:0	0,996	0,959
C20:2n6c	0,996	0,957
C22:0	0,996	0,957
C20:3n6c	0,996	0,956
C22:1n9c	0,996	0,960
C20:3n3c	0,996	0,956
C23:0	0,996	0,962
C20:4n6c	0,996	0,956
C22:2n6c	0,996	0,960
C20:5n6c	0,996	0,957
C24:0	0,997	0,966
C24:1n9c	0,997	0,963
C22:6n3c	0,996	0,958

ANEXO C

Tabela C.1 – Valores em g/100 g de cada Ácido Gordo, assim como de Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados Monoinsaturados e Polinsaturados s obtidos para os replicados da Matriz Leite.

AG	LEITE 1	LEITE 2	LEITE 3	LEITE 4	LEITE 5	LEITE 6	LEITE 7	LEITE 8	LEITE 9	LEITE 10
C4:0	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
C6:0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05
C8:0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
C10:0	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C12:0	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	0,40	0,40	0,40	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,39
C14:1	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
C15:0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	1,14	1,11	1,12	1,11	1,12	1,13	1,12	1,12	1,10	1,10
C16:1	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
C17:0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
C17:1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C18:0	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
C18:1n9t	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
C18:1n9c	0,74	0,71	0,73	0,73	0,72	0,72	0,73	0,72	0,71	0,71
C18:2n6t	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C18:2n6c	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
C20:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C18:3n6c	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1n9c	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C18:3n3c	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AGT	3,32	3,27	3,29	3,30	3,29	3,30	3,30	3,30	3,27	3,27
SAT	2,29	2,26	2,27	2,27	2,27	2,28	2,27	2,28	2,26	2,26
MON	0,91	0,90	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,90	0,91
POLI	0,12	0,11	0,09	0,11	0,11	0,10	0,10	0,11	0,10	0,11

Tabela C.2 – Valores em g/100 g de cada Ácidos Gordo, assim como de Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados Monoinsaturados e Polinsaturados s obtidos para os replicados da Matriz Pão.

AG	PÃO 1	PÃO 2	PÃO 3	PÃO 4	PÃO 5	PÃO 6	PÃO 7	PÃO 8	PÃO 9	PÃO 10
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C12:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	0,42	0,43	0,39	0,41	0,41	0,44	0,41	0,40	0,40	0,42
C16:1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C17:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	0,14	0,14	0,13	0,13	0,13	0,14	0,13	0,13	0,13	0,14
C18:1n9t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
C18:1n9c	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,84	0,83	0,81	0,84	0,85
C18:2n6t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2n6c	1,66	1,66	1,67	1,67	1,67	1,65	1,63	1,59	1,62	1,66
C20:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C18:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1n9c	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,03	0,00
C18:3n3c	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,00	0,03
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00
C20:5n3c	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AGT	3,18	3,20	3,15	3,19	3,17	3,20	3,14	3,06	3,12	3,20
SAT	0,61	0,64	0,59	0,62	0,60	0,65	0,62	0,59	0,59	0,63
MON	0,88	0,88	0,87	0,88	0,87	0,87	0,85	0,82	0,89	0,87
POLI	1,69	1,69	1,70	1,70	1,70	1,69	1,67	1,64	1,63	1,70

Tabela C.3 – Valores em g/100 g de cada Ácidos Gordo, assim como de Ácidos Gordos Totais (AGT), Saturados Monoinsaturados e Polinsaturados s obtidos para os replicados da Matriz Farinha.

AG	FARINHA 1	FARINHA 2	FARINHA 3	FARINHA 4	FARINHA 5	FARINHA 6	FARINHA 7	FARINHA 8	FARINHA 9	FARINHA 10
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	0,79	0,81	0,84	0,83	0,80	0,82	0,80	0,77	0,79	0,81
C16:1	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C17:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
C18:1n9t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:1n9c	0,40	0,40	0,42	0,42	0,40	0,41	0,40	0,40	0,40	0,40
C18:2n6t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2n6c	1,79	1,81	1,86	1,86	1,82	1,86	1,80	1,77	1,81	1,83
C20:0	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:3n6c	0,12	0,08	0,08	0,07	0,03	0,07	0,07	0,06	0,08	0,08
C20:1n9c	0,00	0,00	0,04	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
C22:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AGT	3,17	3,23	3,31	3,32	3,22	3,30	3,21	3,13	3,19	3,24
SAT	0,85	0,88	0,91	0,91	0,87	0,89	0,88	0,83	0,86	0,88
MON	0,41	0,49	0,46	0,50	0,50	0,48	0,45	0,45	0,49	0,49
POLI	1,91	1,86	1,93	1,92	1,85	1,93	1,88	1,84	1,85	1,88